

**Avaliação da toxicidade do tributilestanho sobre a
contratilidade miocárdica.**

Cleydianne Luisa Vieira Pereira

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

VITÓRIA, 2017

Avaliação da toxicidade do tributilestanho sobre a contratilidade miocárdica.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

ORIENTADOR

Prof^a Dr^a Ivanita Stefanon
(PPGCF/UFES/ES)

CO-ORIENTADOR

Prof^o Dr^o Jones Bernades Graceli
(PPGCF/UFES/ES)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, ES

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA CANDIDATA AO
TÍTULO DE MESTRE PELO PPGCF/CCS/UFES**

Nº. Matrícula da Candidata: 2015130642

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de mestrado, intitulada "Avaliação da toxicidade do tributilestanho sobre a contratilidade miocárdica.", apresentada e defendida publicamente pela aluna Cleydianne Luisa Vieira Pereira, no dia 24 de Agosto de 2017, às 13h, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida dissertação de mestrado e, portanto, declara que a aluna faz jus à obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória – ES, 2017

Profª Drª Ivanita Stefanon
(orientadora)

Profª Drª Aurélia Araújo Fernandes
(examinadora externa)

Profº Drº Jones Bernades Graceli
(co-orientador)

Profº Drº José Geraldo Mill
(examinador interno)

Profª Drª Alessandra Simao Padilha
(coordenadora do PPGCF)

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)
Bibliotecário: Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O

Pereira, Cleydianne Luisa Vieira, 1994 -

P436a Avaliação da toxicidade do tributilestanho sobre a contratilidade
Miocárdica / Cleydianne Luisa Vieira Pereira – 2017.
84 f. : il.

Orientador: Ivanita Stefanon.

Coorientador: Jones Bernades Graceli.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Testes de Toxicidade. 2. Contração Miocárdica. 3. Espécies Reativas
de Oxigênio. I. Stefanon, Ivanita. II. Graceli, Jones Bernades.
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde.
IV. Título.

CDU: 612

Dedico este trabalho à minha família, o meu bem mais precioso, principalmente minha mãe, Maria das Graças que sempre fez de tudo, sem medir esforços, para que eu alcançasse meus objetivos. Aos amigos, por todo apoio e bons momentos e ao Hebertt pelo carinho, cuidado e parceria.

*“Não faças de ti
Um sonho a realizar.
Vai.”*

“Cecília Meireles”.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela vida e por todas as pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho.

À professora **Ivanita**, minha orientadora e quem em sempre vou me espelhar para que eu seja pelo menos um décimo do que ela é quando eu crescer. Uma pessoa com o coração enorme e extremamente inteligente. Sempre explica uma, duas ou quantas vezes forem necessárias. Muito obrigada por ter me aberto as portas do LEMC Iva. Obrigada por ser tão atenciosa e paciente. Sou imensamente grata por ser uma *Ivanete*.

Ao professor **Jones**, pela co-orientação. Sempre se mostrou bastante disponível para ajudar no que fosse preciso.

Aos professores do LEMC: **Alessandra, Dalton, Leonardo e Paula**. Todos muitíssimo competentes. Sempre que precisei de ajuda prontamente se dispuseram a fazê-lo. Agradeço por toda contribuição na minha formação.

A todos os professores do programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas pelos ensinamentos.

Ao professor **Helder** que me orientou nos primeiros passos na iniciação científica. Muitíssimo solícito e as tardes de experimentos com os colegas do laboratório eram bem divertidas. Obrigada por mostrar que era possível que eu fizesse mestrado.

Ao **Dr. Donald Bers** e toda a equipe de seu laboratório de análise do cálcio por imagem no Departamento de Farmacologia da Universidade da Califórnia em Davis por autorizar e disponibilizar toda infraestrutura para a realização dos experimentos em cardiomiócitos isolados de ratos e o uso do microscópio confocal. Agradeço ao doutorando **Bruno Jacobson** e a estudante de Iniciação Científica, **Jessica Spalenza** pela ajuda na realização das medidas dos Sparks de cálcio, do transiente e do conteúdo de cálcio em cardiomiócitos isolados. A **Rogério F Ribeiro Jr** pela orientação na análise dos dados.

A **Renata** por sempre ser solícita, me ajudou muito nos meus primeiros dias no laboratório, sempre me deu ISO na concentração que eu precisava, me ajudou com o DHE com toda paciência do mundo enfim obrigada por ter esse coração gigante. Ao **Marito** pela ajuda imensurável no aprendizado da técnica do Langendorff e pela parceria nas disciplinas. A **Elis, Divo, Patrícia e Filipe Filett** pelas incontáveis caronas. A **Camila e Gilson** pela diluição de fármacos quando eu estava desesperada pelas férias do Anderson. A **Gérsica** por todo apoio e pelas várias ratas que já compartilhamos. A **Carol Ximenes** por todos os conselhos e colaboração no trabalho. A **Karol Ronconi** doce e meiga trabalha muito e sempre me ajudou em tudo que pôde. A **Wena**, a bonita. Estava comigo na minha primeira leva de experimentos me ajudando e saímos juntas bem tarde do laboratório. Senão tivesse comigo nem sei como faria nesse dia, obrigada!

A **Sabrina**, amiga linda que o mestrado me deu. Aquela que a primeira vez que vi achei a mais metida de todas e hoje tornou-se minha querida amiga. Obrigada pelo ser humano lindo que você é. Sempre muito divertida, é impossível ficar triste perto de você. Incrivelmente inteligente, nossa dupla dinâmica funcionava muito bem nas disciplinas. Uma pessoa iluminada que contagia todos a sua volta com sua alegria. Sou muito grata por sua amizade Sá.

A todos os demais colegas do LEMC pela convivência, ajuda e pelas boas risadas quando tudo dava errado e a vontade era de chorar: **Ariane, Bianca, Bruna, Bruno, Cindy, David, Dieli, Emilly, Evellyn, Felipe Strella, Grazi, Karol Zuqui, Maylla, Paula, Paloma, Priscilla Tosta, Raquel, Samya, Suzana, Tati, Thiago Oliveira, Thiago Lopes e Vinícius.**

Aos alunos de iniciação científica, **Amanda, André, Jéssica, Kamila e Paula** pela ajuda na realização deste trabalho.

Ao **Anderson** por tudo! Diluições, soluções nutritivas e soluções para quaisquer problemas que aparecessem e estivessem ao seu alcance em resolvê-los e também pelas conversas sobre a vida.

A todos os colegas da Pós Graduação em especial a **Poli** pelos conselhos e **Glauciene** por me salvar no dia que precisava de OCT. Ao **Eduardo** e a **Priscila Podrask** por ajudar nas diluições com TBT e colaboração no trabalho.

A toda minha família sem a qual nada disso seria possível. Agradeço muito a Deus pela família maravilhosa que tenho. Família de gente muito batalhadora, humilde e acima de tudo

feliz. Nada como o aconchego da casa da **vó Glória** aos domingos depois de uma semana puxada. Aos meus tios e tias: **Antônio, Gegê, Liane, Lúcia, Luzia, Mônica, Rosângela, Sérgio, Tião**. Ao meu irmão **Gabriel** e aos meus primos **Ana Luiza, Arce, Ariane, Dênis, Diego, Dionízio, Igor, Jean e Mateus** pelos finais de semana repletos de risadas e músicas ao vivo cantadas por nós mesmos.

A pessoa mais guerreira que conheço nessa vida, a minha **mãe, Maria das Graças**. Sempre fez de tudo e trabalhou demasiadamente para que eu pudesse estudar. A pessoa por quem eu tenho a maior gratidão desse universo e um amor infinito. Palavras não conseguiriam expressar como sou grata por ter você como mãe. Obrigada simplesmente por existir e por cuidar de mim tão bem assim!

A minha melhor pessoa, **Hebertt**. Obrigada meu bem por todo amor e carinho. Obrigada por ser meu porto seguro, meu parceiro e conselheiro para todas as horas. Você foi a pessoa que mais me incentivou para fazer a prova do mestrado. Agradeço a Deus por ter colocado você no meu caminho. Sempre que precisei você estava lá para me ajudar. Nos momentos de felicidade você riu comigo. Nos momentos de aflição e angústia você também estava lá para me mostrar que talvez nem fosse tão angustiante assim. Obrigada de coração por você ser assim, tão adorável! Gostaria de agradecer também a sua família por sempre me acolher tão bem, **Vanda, José Lima, Raíssa e Bruno**.

Aos grandes amigos que a Biologia me deu: **Fernanda**, minha eterna miguxa. Obrigada por todas as conversas, conselhos, cafés, cantorias e altas risadas. **Josinei**, para quem eu sempre ligava para saber onde era a aula. Obrigada meu amigo. Sei que sempre poderei contar com você. **Wanderson, Fernando e João**, obrigada pelos bons momentos na faculdade. Foram inúmeros seminários, estágios e provas. Vocês tornaram tudo mais agradável. As minhas amigas desde o ensino médio **Tati Possati e Amanda Liuth**. Vocês moram no meu coração.

Deixo aqui registrado minha gratidão para todos que de alguma forma me ajudaram a alcançar meu objetivo.

Ao CNPq e a FAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	16
ABSTRACT.....	18
1.INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Aspectos gerais e uso industrial	21
1.2 Toxicidade e Propriedades Físico-Químicas.....	23
1.3 Fontes de Exposição Humana /Animal aos organoestânicos	24
1.4 Legislação	25
1.5 Efeitos Biológicos	26
1.6 Efeitos Vasculares	28
1.7 Efeitos cardíacos	29
1.8 Acoplamento Excitação-Contração Cardíaco	29
1.9 Espécies reativas de oxigênio e contratilidade miocárdica.....	32
2. OBJETIVO	36
2.1 Objetivo.....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Protocolos experimentais.....	39
3.1.1 Avaliação do efeito agudo do TBT em músculo papilar	39
3.1.2 Avaliação dos parâmetros cardíacos em corações isolados e perfundidos pela técnica de Lagendorff	40
3.1.2 Protocolo experimental durante a perfusão do coração isolado.....	41
3.2. Avaliação do estresse oxidativo miocárdico.....	42
3.2.1 Papel das EROs nos efeitos agudos do TBT sobre a contratilidade do músculo cardíaco	42
3.2.2 Avaliação “in situ” do $O_2^{\cdot-}$ pela técnica de fluorescência com dihidroetídio.....	42
3.2.3 Medição dos <i>sparks</i> , conteúdo e transiente de Ca^{2+} do RS em cardiomiócitos	43
3.2.3.1 Cardiomiócitos Permeabilizados: análise dos <i>Sparks</i> de Ca^{2+}	44
3.2.3.2 Medida do Conteúdo de Ca^{2+} do RS usando Cafeína 10 mM	44
3.2.3.3 Análise do transiente de Ca^{2+}	45
3.3. Drogas e reagentes	45

4. RESULTADOS	47
4.1 Efeito Agudo do TBT sobre o Músculo Papilar	48
4.2 Efeito agudo do TBT 50 µM sobre o coração isolado	49
4.3 Avaliação do estresse oxidativo miocárdico.....	59
4.4 Spark de Ca²⁺	61
5. DISCUSSÃO.....	67
6 REFERÊNCIAS	74

LISTA DE ABREVIACÕES

[Ca²⁺]_i : Cálcio intracelular

+ dP/dt : Derivada Positiva

-dP/dt : Derivada Negativa

AECC: Acoplamento Excitação Contração Cardíaco

AMPC: Monofosfato cíclico de adenosina

ANOVA: Análise de Variância

CaCl₂: Cloreto de cálcio

CEUA: Comissão de Ética em Uso de Animais

DHE: Dihidroetídio

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

FDHM: Duração total dos sparks na metade da amplitude máxima

FWHM: Largura total dos sparks na metade da amplitude máxima

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

NADPH : Nicotinamida Adenina Dinucleótideo Fosfato

O₂^{•-}: Ânion superóxido

OH•: Radical hidroxila

PD: Pressão Diastólica

PKA: Proteína cinase A

PLB: Fosfolamban

PPC: Pressão de Perfusão Coronariana

PSIVE: Pressão Sistólica Intraventricular Esquerda

PVC - Cloreto de Polivinila

RyR2: Receptor de Rianodina

SERCA: Bomba de Cálcio do Retículo Sarcoplasmático

SOD- Superóxido Desmutase

TBT – Tributilestanho

TPT – Trifenilestanho

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação esquemática do transporte de Ca^{2+} no acoplamento excitação contração cardíaco. SR: retículo sarcoplasmático, ATP: ATPase, PLB: fosfolamban, NCX: trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, RyR: receptor de Rianodina, AP: potencial de ação, I_{Ca} : corrente de Ca^{2+} . Bers, 2002..... 31
- Figura 2** Influência das EROs no AECC por várias vias. Modificado de Kohler et al., 2014. 34
- Figura 3** Registro representativo da curva de Frank Starling, onde foram medidas as variações da pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE mmHg) nas concentrações de Ca^{2+} de 0,62 e 1,25 mM para os aumentos crescentes da pressão diastólica do ventrículo esquerdo (PD) de 0 até 30 mmHg em intervalos de 5 mmHg..... 41
- Figura 4** Registro representativo do efeito inotrópico positivo em concentrações crescentes de Ca^{2+} extracelular (0,62; 1,25; 1,87; 2,5 e 3.12 mM)..... 42
- Figura 5** Efeito de concentrações crescentes de TBT (10^{-9} – 10^{-2} M) no desenvolvimento de força ativa nos músculos papilares isolados contraindo isometricamente. Cada condição foi mantida por 3 minutos (n=5). Dados expressos como Média \pm EPM. 48
- Figura 6** Resposta inotrópica positiva frente ao aumento de Ca^{2+} extracelular de 0,62 até 3,12 mM. A: Curva de Ca^{2+} dos grupos Controle (n=7) e TBT (50 μM , n=8) B: Valores percentuais da curva de Ca^{2+} ; C: Primeira derivada positiva ($dP/dt +$) D: Valores percentuais da $dP/dt +$, E: Primeira derivada negativa ($dP/dt -$) F: Valores percentuais da $dP/dt -$;G: Registro representativo do grupo Controle e H: Registro representativo do grupo TBT. Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias.* $p < 0,05$ TBT vs Controle..... 51
- Figura 7** Efeitos dos antioxidantes sobre a resposta inotrópica ao Ca^{2+} . A: Grupos Controle, TBT (50 μM) e TBT + Tiron (500 μM) B: Grupos Controle, TBT e TBT + Tempol (100 μM) C: Grupos Controle, TBT e TBT + Apocinina (30 μM) e D: Grupo Controle, TBT e TBT + Losartan (10 μM). Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias.* $p < 0,05$ TBT vs Controle, # $p < 0,05$ TBT + Tiron vs TBT. 52
- Figura 8** Curva de função ventricular: Pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE) e pressão diastólica (PD) em cálcio 1,25 mM; A: Grupos Controle, TBT (50 μM) e

TBT + Tiron (500 μ M) B: Grupos Controle, TBT e TBT + Tempol (100 μ M) C: Grupos Controle, TBT e TBT + Apocinina (30 μ M) e D: Grupo Controle, TBT e TBT + Losartan (10 μ M). Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias.* $p < 0,05$ TBT vs Controle ; # $p < 0,05$ TBT + Tiron vs TBT. 53

Figura 9 Curva de função ventricular: Pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE) e pressão diastólica (PD) em Ca^{2+} 0,62 mM; A: Grupos Controle, TBT (50 μ M) e TBT + Tiron (500 μ M) B: Grupos Controle, TBT e TBT + Tempol (100 μ M) C: Grupos Controle, TBT e TBT + Apocinina (30 μ M) e D: Grupo Controle, TBT e TBT + Losartan (10 μ M). Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias.* $p < 0,05$ TBT vs Controle ; # $p < 0,05$ TBT + Tempol vs TBT..... 54

Figura 10 Curva de função ventricular e valores percentuais: Pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE) e pressão diastólica (PD). A: em Ca^{2+} 1,25 mM; B: valores percentuais em Ca^{2+} 1,25; C: em Ca^{2+} 0,62 mM e D: valores percentuais em Ca^{2+} 0,62 mM dos Grupos Controle e TBT (50 μ M). Valores percentuais foram corrigidos em relação à PD=0 mmHg. Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias.* $p < 0,05$ TBT vs Controle. 55

Figura 11 Efeitos da ativação β -adrenérgica por isoproterenol [Iso (100 μ L, 10^{-4} M, in bolus)] no sistema Lagendorff. A: Pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE); B:Primeira derivada positiva ($dP/dt +$) e C primeira derivada negativa ($dP/dt -$) dos grupos Controle (n=7), TBT (50 μ M, n=8), TBT + Tiron (500 μ M) (n=5), TBT + Tempol(100 μ M) (n=5), TBT + Apocinina (30 μ M)(n=4) and TBT + Losartan (10 μ M) (n=5). Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias.* $p < 0,05$ TBT vs Controle 56

Figura 12 Avaliação dos parâmetros temporais da contração do músculo cardíaco. A: tempo de ativação durante a curva de cálcio; B: tempo de relaxamento 90 % durante a curva de Ca^{2+} ; C: Tempo de ativação na dose de Isoproterenol (100 μ L, 10^{-4} M, in bolus) e D: tempo de relaxamento 90% na dose de isoproterenol dos grupos Controle (n=7) e TBT (50 μ M, n=8). Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias e Teste t (Isoproterenol)* $p < 0,05$ TBT vs Controle..... 57

Figura 13 Valores basais de parâmetros coronarianos. Pressão de perfusão coronariana (PPC) dos grupos Controle (n=7), TBT (50 μ M, n=8), TBT + Tiron (500 μ M) (n=5),TBT + Tempol(100 μ M) (n=5), TBT + Apocinina (30 μ M)(n=4) and TBT + Losartan (10 μ M)

(n=5). Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias.* $p < 0,05$ TBT vs Controle 58

Figura 14 Detecção *in situ* de anion superóxido. Micrografias de fluorescência do coração coradas com o corante sensível ao $O_2^{\bullet-}$ DHE (fluorescência vermelha) foram obtidas dos grupos Controle (n=4), TBT (n=4), TBT + Tiron (500 μ M) (n=4), TBT + Tempol(100 μ M) (n=4), TBT + Apocinina (30 μ M)(n=4) e TBT + Losartan (10 μ M) (n=4). Imagens foram adquiridas em idênticas configurações. Dados expressos como Média \pm EPM.* $p < 0.05$ vs Controle, # $p < 0.05$ vs TBT 59

Figura15 Detecção *in situ* de anion superóxido *in vitro* após 15 min de incubação com TBT(50 μ M) e antioxidantes. Micrografias de fluorescência do coração coradas com o corante sensível ao $O_2^{\bullet-}$ DHE (fluorescência vermelha) foram obtidas dos grupos Controle (n=3), TBT (n=3), TBT + Tiron (500 μ M) (n=3), TBT + Tempol(100 μ M) (n=3) e TBT + Losartan (10 μ M) (n=3). Imagens foram adquiridas em idênticas configurações. Dados expressos como Média \pm EPM.* $p < 0.05$ vs Controle, # $p < 0.05$ vs TBT 60

Figura 16 Análise dos *sparks* de Ca^{2+} no cardiomiócito. A: frequência; B: amplitude e C: representação dos *sparks* de Ca^{2+} após 5 minutos dos grupos Controle (n=4), TBT 10^{-7} M (n=4) e TBT 10^{-8} M (n=4). Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias.* $p < 0,05$ vs Controle 61

Figura 17 A: FWHM e B: FDHM dos grupos Controle (n=4) e TBT 10^{-7} M (n=4). Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias.* $p < 0,05$ 62

Figura 18 Transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos intactos dos grupos Controle (n=15) e TBT 10^{-7} M (n=3). A: Imagens confocais representativas do transiente de Ca^{2+} antes e depois da adição de TBT e B: Transiente de Ca^{2+} . Os dados de fluorescência foram normalizados como $\Delta F / F_0$, onde ΔF é a intensidade de fluorescência e F_0 é a fluorescência média em repouso. Dados expressos como Média \pm EPM. Teste t, * $p < 0,05$ TBT vs Controle..... 63

Figura 19 Conteúdo de Ca^{2+} em cardiomiócitos intactos de ratos. A: Pico de liberação de Ca^{2+} do RS induzido por cafeína (10 mM) B: Representação da liberação de Ca^{2+} do RS induzida por cafeína dos grupos Controle (n=4) e TBT 10^{-7} (n=3) C: Efeitos do dantrolene (10 μ M) na liberação de Ca^{2+} induzida por cafeína dos grupos Controle (n=4) e TBT 10^{-7} (n=3) e D: Representação dos efeitos do dantrolene dos grupos Controle + Dantrolene (n=2) e TBT

10⁻⁷+ Dantrolene (n=2). Os dados de fluorescência foram normalizados como $\Delta F / F_0$, onde ΔF é a intensidade de fluorescência e F_0 é a fluorescência média em repouso. Dados expressos como Média \pm EPM. Teste t, *p<0,05 TBT vs Controle. 64

Figura 20 Efeitos do bloqueio do trocador Na⁺/Ca²⁺ no transiente de Ca²⁺ de cardiomiócitos intactos. A: Imagem representativa do transiente de Ca²⁺ e B: Transiente de Ca²⁺ dos grupos Controle + NCX blocker (n=3) e TBT 10⁻⁷+ NCX blocker (n=3). Os dados de fluorescência foram normalizados como $\Delta F / F_0$, onde ΔF é a intensidade de fluorescência e F_0 é a fluorescência média em repouso. . Dados expressos como Média \pm EPM. Teste t, * p<0,05 TBT vs Controle. 65

Figura 21 Pressão diastólica em corações isolados. A: durante a curva de Ca²⁺ e B: antes e após a realização de todos os protocolos dos grupos Controle (n=7) e TBT (50 μ M, n=8) em corações isolados pela técnica de Langendorff. Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias.* p<0,05 TBT vs Controle. 66

Figura 22 Esquema representativo dos possíveis mecanismos de ação do TBT sobre a contratilidade miocárdica 73

RESUMO

O Tributilestanho (TBT) é um composto poluente organoestânico, utilizado em lavouras e tintas anti-incrustantes. Sua liberação diretamente na água, proveniente de barcos, estaleiros e portos, originou impactos ambientais em ecossistemas aquáticos e terrestres. Os compostos organoestânicos produzem efeitos neuro-, cito- e genotóxicos em vários sistemas. Entretanto, ainda não está totalmente elucidado seu efeito tóxico sobre o sistema cardiovascular. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito agudo do TBT sobre a contratilidade miocárdica. Ratas Wistar pesando entre 200 e 250 g foram anestesiadas com injeção intraperitoneal de ketamina (40mg/Kg) e xilazina (8mg/Kg). O coração foi isolado e perfundido através da Técnica de Langendorff e nutridos com solução de Krebs modificado, pH 7.4, 37° C. A pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE) foi avaliada através da inserção de um balão de látex no VE o qual foi estirado para medida da pressão diastólica do ventrículo esquerdo (PD). Os animais experimentais foram agrupados aleatoriamente em: Grupo controle (N=7) e grupo perfundido durante 5 minutos com solução de TBT (50 µM) (Grupo TBT N=8). Para avaliar a participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre os efeitos do TBT, os corações foram perfundidos com agentes anti-oxidantes: Tiron (500 µM, N=5), Tempol (100 µM, N=5), Apocinina (100 µM, N=4) e com o bloqueador de receptor de angiotensina tipo 1 (AT1) Losartan (10 µM, N=5). A contratilidade miocárdica foi avaliada medindo-se a PSIVE frente a estímulos homeométricos como o aumento da concentração de Ca^{2+} e na presença do agonista β -adrenérgico isoproterenol (injeção *in bolus*, 100 µL, 10^{-4} M) e heterométrico através da análise de curva de Frank Starling durante o aumento da PD de 0 até 30 mmHg em intervalos de 5 mmHg. O efeito agudo do TBT sobre as EROs foi avaliado pela técnica do dihidroetídio (Unidades Arbitrárias, UA). Em outro grupo de ratos wistar (250 g) foram realizadas as medidas dos *sparks*, do transiente e conteúdo de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS). Os resultados foram apresentados como média \pm EPM. A análise estatística usada foi Teste t, ANOVA 1 ou 2 vias com post hoc de Tukey, significante $p < 0,05$. Todos os protocolos foram aprovados pelo CEUA/UFES (27/2016). A perfusão com TBT induziu efeito inotrópico negativo evidenciado pela menor resposta contrátil frente ao aumento de Ca^{2+} ($CaCl_2$ 1,25 mM, PD= 10 mmHg, Controle= 115 ± 9 vs TBT= 66 ± 4 mmHg, $p < 0,05$) que não foi prevenida com o uso de antioxidantes. A exposição aguda ao TBT determinou redução na PSIVE desenvolvida na curva de Frank Starling, (Ca^{2+} 1,25 mM, PD=10mmHg, Controle= 88 ± 6 vs TBT= 45 ± 2 mmHg, $p < 0,05$) e a perfusão com antioxidantes protegeu parcialmente a redução da contratilidade. Tiron,

tempol, apocinina e losartan impediram o efeito inotrópico negativo nas curvas de Frank-Starling apenas em baixo Ca^{2+} (0,62 mM). O TBT diminui a resposta ao isoproterenol (Controle= $132,78 \pm 22$ vs TBT= $24,14 \pm 13,08$ mmHg $p < 0,05$). A exposição aguda ao TBT aumentou a produção *in situ* de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Controle = $0,065 \pm 0,002$ vs TBT $0,094 \pm 0,004$ UA $p < 0,05$) que foi prevenido com a perfusão com tempol e o losartan (Tempol $0,074 \pm 0,003$, Losartan $0,071 \pm 0,004$ UA $p < 0,05$). Nos cardiomiócitos isolados, o TBT aumentou a frequência dos *sparks* (Controle= 9 ± 1 vs TBT 10^{-7} M= 16 ± 1 100 $\mu\text{m/s}$, $p < 0,05$), diminuiu sua amplitude (Controle = $0,582 \pm 0,08$ vs TBT 10^{-7} M = $0,342 \pm 0,05$ $\Delta F/F_0$, $p < 0,05$) e diminuiu o transiente e o conteúdo de Ca^{2+} do RS. A exposição aguda ao TBT 50 μM promoveu efeito inotrópico negativo no coração, aumentou a produção cardíaca de EROs, diminuiu o conteúdo de Ca^{2+} do RS e aumentou a frequência espontânea dos *sparks* de Ca^{2+} . Os resultados sugerem que o TBT atue sobre as proteínas reguladoras do movimento de Ca^{2+} desestabilizando o receptor de RyR2 e reduzindo a atividade da bomba de Ca^{2+} do RS, SERCA2a, que parecem ser modulados, pelo menos em parte, pelas EROs.

Palavras-chave: 1. Tributilestanho 2. Contratilidade miocárdica 3. Espécies reativas de oxigênio 4. Sparks de cálcio 5. RyR2 6. SERCA2a

ABSTRACT

Tributyltin (TBT) is an organotin environmental contaminant used in farming and antifouling paints. Its release directly into the water, from ships, shipyards and ports, was the cause of environmental impacts on aquatic ecosystems. Numerous studies indicate that organotin compounds produce neuro, cito and genotoxic effects in various systems. However, its toxic effect on the cardiovascular system has not yet been fully elucidated. The aim of this study was to analyze the acute effect of TBT on myocardial contractility. Wistar rats weighing 200 - 250 g were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (40 mg / kg) and Xilazine (8 mg / kg). The heart was isolated and perfused by the Langendorff Technique in Krebs solution, pH 7.4, 37° C. The left ventricular isovolumetric systolic pressure (LVISP) was assessed by insertion of a latex balloon in the LV which was stretched to measure left ventricular diastolic pressure (DP). Experimental animals were randomly grouped into: Control group (N = 7) and group perfused for 5 minutes with TBT solution (50 µM) (TBT group N = 8). To evaluate the participation of reactive oxygen species (ROS) on the effects of TBT, hearts were perfused with anti-oxidants: Tiron (500 µM, N = 5), Tempol (100 µM, N = 5), Apocynin 100 µM, N = 4) and angiotensin receptor blocker, Losartan (10 µM, N = 5). Myocardial contractility was evaluated by homeometric stimulus: calcium and β -adrenergic agonist isoproterenol (injection *in bolus*, 100 µL, 10^{-4} M). The heterometric response was assessed using the Frank Starling mechanism by increasing the DP from 0 to 30 mmHg in 5 mmHg intervals. The acute effect of TBT on ROS was evaluated by dihydroethidium technique (Arbitrary Units, AU). In another group of rats, cardiomyocytes were isolated using collagenase in order to measure Ca^{2+} sparks frequency and amplitude during rest condition and Ca^{2+} transient in cells stimulated at 0.5 Hz. The Ca^{2+} content of the sarcoplasmic reticulum (SR) was evaluated using caffeine (10 mM) in intact cardiomyocytes. The results were presented as mean \pm SEM. The statistical analysis used was ANOVA 1 or 2 ways with Tukey post hoc, $p < 0.05$. All protocols were approved by CEUA/UFES (27/2016). Perfusion with TBT induced a negative inotropic effect evidenced by the lower contractile response to calcium increase (Control = 115 ± 9 vs TBT = 66 ± 4 mmHg, 1.25 mM CaCl_2 , $p < 0.05$). Acute exposure to TBT resulted in a reduction in the pressure developed in the Frank Starling curve, in 1.25 mM calcium in all DP (Control = 88 ± 6 vs TBT = 45 ± 2 mmHg, DP = 10 mmHg, $p < 0.05$) and only the antioxidant tiron reversed this reduction in lower DP (TBT = 45 ± 2 vs TBT + tiron = 79 ± 6 mmHg, $p < 0.05$). TBT significantly reduced the response to

isoproterenol (Control = 132.78 ± 22 vs TBT = $24,14 \pm 13.08$ mmHg, $p < 0.05$). Total exposure to TBT increased in situ production of $O_2^{\bullet -}$ (Control group = 0.065 ± 0.002 vs TBT group 0.094 ± 0.004 AU $p < 0.05$) and only Tempol and Losartan were able to reverse (TBT + Tempol 0.074 ± 0.003 and TBT+Losartan 0.071 ± 0.004 AU, $p < 0.05$). TBT increased the sparks frequency (Control = 9 ± 1 vs TBT 10^{-7} M = 16 ± 1.1 $\mu\text{m/s}$), decreased its amplitude (Control = 0.582 ± 0.08 vs TBT 10^{-7} M = 0.342 ± 0.05 , $p < 0, 05$), decreased the Ca^{2+} transient and the SR Ca^{2+} content. The results demonstrate that TBT induced an important negative inotropic effect that may depend on the Ca^{2+} regulatory proteins destabilizing the RyR2 receptor and reducing the activity of the SR Ca^{2+} pump, SERCA2a, which appear to be modulated, at least in part, by ROS.

Keywords: 1. Tributyltin 2. Myocardial contractility 3. Reactive oxygen species 4. Calcium Sparks 5. RyR2 6. SERCA2a

1.INTRODUÇÃO

1 Compostos Organoestânicos

1.1 Aspectos gerais e uso industrial

Compostos organoestânicos compreendem o grupo de organometálicos caracterizados pela presença de um átomo de estanho ligado a radicais orgânicos. Quimicamente esses compostos são representados pela fórmula geral $R\text{SnX}_3$, $R_2\text{SnX}_2$, $R_3\text{SnX}$ e $R_4\text{Sn}$, onde R é um grupo alquil ou aril e X é uma espécie aniônica como por exemplo um haleto, um óxido ou hidróxido (Hoch, 2001).

Esses compostos possuem propriedades e aplicações que variam de acordo com o número de ligações estanho-carbono e são amplamente utilizados comercialmente em várias áreas (Felizzola, 2005; Santalla, 2008;). A utilização do tributilestanho e do trifenilestanho, TBT e TPT respectivamente, como componentes de tintas anti- incrustantes, é a principal forma de entrada desses compostos no meio aquático (Hoch, 2001; Rüdel, 2003; Godoi et al., 2003). Muitos trabalhos indicam uma maior concentração de TBT e TPT em áreas costeiras, próximas a portos os quais são locais onde os navios permanecem durante dias esperando para serem carregados, ou em docas e marinas, onde são realizadas as manutenções das embarcações (Dos Santos, 2008).

Outras formas pelas quais os organoestânicos podem chegar ao ambiente incluem a utilização de biocidas industriais e agrícolas, embalagem de alimentos, reservatórios de água, espuma de poliuretano, desinfetantes, equipamentos elétricos e em muitos outros produtos do consumo humano (Dos Santos, 2008). Além disso, esses compostos são utilizados como estabilizadores de PVC (cloreto de povinila) e por isso, efluentes municipais e industriais, podem constituir uma importante fonte desses compostos para o ambiente aquático (Rüdel, 2003).

Apesar do extenso uso industrial, os compostos organoestânicos possuem um grande potencial tóxico para a biota aquática. Dentre estes animais, os moluscos se enquadram como o principal objeto de estudo das pesquisas, refletindo sua importância ecológica, comercial e sua utilização como bioindicadores de poluição aquática (Ketata et al., 2008)

Além do uso industrial, os compostos organoestânicos apresentam-se como potenciais quimioterápicos no tratamento clínico do câncer por possuírem significativa atividade antiproliferativa (Hadjikakou e Hadjiliadis, 2009). O mecanismo exato da atividade

antiploriferativa não está totalmente elucidado, embora estudos indiquem que a grande afinidade destes compostos com radicais tiois e a ligação destes ao DNA pode ser a razão para a potencial atividade anticancerígena dos compostos organoestânicos (Nath et al., 2014).

1.2 Toxicidade e Propriedades Físico-Químicas

Sabe-se que os organoestânicos são tóxicos em concentrações relativamente baixas de exposição não só para os invertebrados marinhos, mas também para os mamíferos e outros animais. A toxicidade dos compostos organoestânicos aumenta com o número de grupos alquil ligados. Os compostos mais tóxicos são os de triálquil-estanho, seguidos pelos compostos de dialquil- e monoalquil-estanho ($R_3Sn^+ > R_2Sn^{2+} > RSn^{3+}$) (Poller, 1970; Donard e Weber, 1985). A mais alta toxicidade entre os compostos butil-estanho é encontrada no TBT (Maguire, 1987).

Compostos organoestânicos são irritantes para os olhos, vias respiratórias e pele, e alguns podem causar edema cerebral e produzir efeitos no sistema nervoso central e sistema cardiovascular. Manifestações de toxicidade são devidas principalmente a efeitos sobre o sistema nervoso central: dor de cabeça, náuseas, vômitos e tonturas e, por vezes, convulsões e perda de consciência. Fotofobia, convulsões e perturbações mentais podem ocorrer. A dor epigástrica é relatada quando ocorre intoxicação por inalação (Poller, 1970).

Os níveis de toxicidade estão relacionados à concentração, tempo de exposição, biodisponibilidade e sensibilidade da biota, como também a persistência dos compostos organoestânicos no meio ambiente (De Carvalho Oliveira e Santelli, 2010). O tempo de meia vida e a biodisponibilidade do TBT na água varia de alguns dias a algumas semanas e é dependente de vários parâmetros ambientais como o pH, temperatura, turbidez e luminosidade (Sarradin et al., 1995). Uma vez na água, o TBT apresenta degradação química, fotoquímica, bioquímica, sucessivamente de, di-n- butilestanho (DBT), mono -n- butilestanho (MBT) até estanho inorgânico (Sn IV) (Laughlin et al., 1985).

Devido a baixa solubilidade em água e seu caráter lipofílico o TBT adere-se facilmente em partículas e pode permanecer no sedimento durante vários anos (Sekizawa, 1998; Hwang et al., 1999). Os sedimentos são susceptíveis a atuar como um importante reservatório e uma fonte potencial de poluição além de fornecer um meio valioso para avaliação da contaminação por esse composto.

1.3 Fontes de Exposição Humana /Animal aos organoestânicos

O trato gastrointestinal é a principal via pela qual os seres humanos são expostos a produtos químicos ambientais. As principais fontes de exposição aos compostos organoestânicos para seres humanos são por meio da dieta, tais como frutos do mar e mariscos (Takahashi et al., 1999 e Keithly et al., 1999) e por meio da ingestão de água contaminada com organoestânicos devido à exposição desta a agentes anti-incrustantes e fungicidas além da lixiviação de canos de água de PVC e plásticos de PVC utilizados em embalagens de alimentos (Sadiki e Williams, 1999)

Outras possíveis vias de exposição humana aos organoestânicos incluem a sua utilização como agentes anti-fúngicos em madeira, sistemas industriais de água e têxteis. Tem sido reconhecido que os organoestânicos utilizados em vários produtos de consumo podem migrar de tais produtos durante o uso normal e contribuir para a presença generalizada desses compostos em ambientes fechados (Sadiki e Williams, 1999). Fontes adicionais incluem líquidos armazenados em recipientes de plástico, como por exemplo várias bebidas alcoólicas (vinhos portuários)(Liu et.al., 2002; Azenha et.al, 2008). Além disso, a utilização mundial de TBT em tintas anti-incrustantes resultou em contaminação em escala global com impactos importantes nas populações de ostras e outros moluscos marinhos.

Os níveis medidos de compostos organoestânicos (di-n-butilestanho e tri-n-butilestanho) em amostras de tecidos humanos e outros animais, estão entre 3-100 nM.(Nielsen e Strand,2002). Os butilestanhos têm sido detectados em sangue humano nas concentrações de 64-155 ng/ml as quais são suficientes para causar efeitos tóxicos imunológicos in vitro (Whalen et.al., 1999). Takahashi (1999) relatou a presença de resíduos de butilestanho no fígado de macacos e outros mamíferos, bem como no fígado humano, e foi sugerido que a utilização em produtos de consumo podem representar uma rota importante de exposição. Tem sido reportado que em muitas espécies, incluindo mamíferos, os compostos organoestânicos tendem a se acumular em certos órgãos como fígado, rins e cérebro (Fait et al., 1994).

1.4 Legislação

A bioincrustação é um fenômeno natural no qual diversos organismos (algas, bactérias, fungos, mexilhões) aderem a algum substrato submerso como, por exemplo, em cascos de navios. A presença desses organismos nos cascos de navio provoca danos estruturais e prejuízos econômicos uma vez a incrustação torna irregular a superfície dos cascos, aumentando o arrasto e reduzindo a velocidade e consequentemente elevando a necessidade de consumo de combustível. A incrustação de 10µm no casco de um navio pode significar um aumento de 0,3 a 1% no consumo de combustível (Champ e Lowenstein, 1987; Santalla, 2008)

A incrustação de organismos é um processo que pode ser controlado com a utilização de tintas contendo componentes anti-incrustantes. Nos primórdios eram utilizadas substâncias naturais como a cera para revestir os cascos dos navios, que eram feitos de madeira. Fenícios e Cartagineses utilizavam cobre para esse propósito (Almeida et al., 2007a) e em 1961, foi desenvolvida a primeira tinta contendo um composto organoestânico como biocida. Devido à sua grande efetividade contra a incrustação, o uso destas tintas aumentou consideravelmente nas décadas seguintes (Tolosa et al., 1996). Até os anos 90, o consumo mundial destes produtos aumentou de 1.500 para 50.000 toneladas por ano (Santalla, 2008).

Apesar do aumento drástico na utilização destes compostos, principalmente aqueles contendo tributilestanho (TBT), estes se mostraram altamente tóxicos, afetando inclusive organismos não-alvo, tais como peixes, bivalves, gastrópodes, crustáceos e algas. Na França, em 1982, ocorreu um decréscimo significativo na produção de ostras da espécie *Crassostrea gigas*. Esses animais apresentavam mal formação na concha e cerca de 80 a 100% de sua população era afetada. Baseando-se nos impactos do TBT sobre a produção dessas ostras a França foi um dos primeiros países a adotar ações regulatórias envolvendo o uso de compostos organoestânicos, seguido pela Inglaterra em 1985 (Alzieu, 2000).

A toxicidade destes compostos chamou a atenção do Comitê de Proteção do Ambiente Marinho (MEPC) da Organização Marítima Internacional (IMO). Como resultado, em 1990, a IMO adotou uma resolução recomendando aos governos a adotarem medidas para a eliminação do uso de tintas anti-incrustantes à base de TBT. Em 1999, a IMO adotou uma resolução referindo-se à proibição global da aplicação de compostos organoestânicos em

embarcações a partir de 1º de janeiro de 2003, sendo o prazo limite para a circulação de navios contendo esses compostos, aplicados em seus cascos, até 1º de janeiro de 2008 (Dos Santos, 2008).

O Brasil assinou este documento em 13 de novembro de 2002 (NORMAM-23/DPC, 2007). Em novembro de 2007, entrou em vigência no Brasil a Portaria 76 da Diretoria de Portos e Costas, da Marinha do Brasil, que aprova as Normas da Autoridade Marítima para o Controle de Sistemas Anti-incrustantes Danosos em Embarcações – NORMAM-23/DPC. Estas normas têm o objetivo de estabelecer procedimentos para controlar o uso de sistemas anti-incrustantes danosos ao meio ambiente marinho ou à saúde humana e aplicam-se tanto a embarcações brasileiras quanto a embarcações estrangeiras que atracarem no Brasil. Apesar de haver legislação, a falta de fiscalização efetiva é um dos obstáculos para se controlar a contaminação do ambiente pelos organoestânicos (Castro et al., 2007).

No estado do Espírito Santo, que possui um extenso litoral, o Laboratório de Malacologia da Universidade Federal do Espírito Santo, sob a coordenação da Dra. Mércia B. Costa, iniciou estudos de biomonitoramento em alguns pontos do litoral capixaba. Foi observada uma grande contaminação por organoestânicos incluindo a presença de diversas fêmeas de gastrópodes com problemas reprodutivos (Costa et al., 2008).

1.5 Efeitos Biológicos

Os compostos organoestânicos afetam uma variedade de fatores bioquímicos e sistemas fisiológicos e seu modo de ação varia de acordo com o composto, dose, a espécie em questão e a via de administração. No que diz respeito ao meio aquático vários trabalhos demonstram os efeitos tóxicos desses compostos sobre os invertebrados, principalmente no desenvolvimento sexual e reprodutivo dos moluscos (Ketata et al., 2008). O fenômeno do imposex, que consiste na sobreposição de caracteres sexuais masculinos em fêmeas de moluscos, é bastante estudado. Quando isso ocorre acarreta uma síndrome endócrina que, dependendo do grau de contaminação, pode levar à diminuição considerável nas populações mais sensíveis (Costa et al., 2008).

Apesar de se saber da relação entre organoestânicos e imposex ainda não é conhecido o mecanismo exato pelo qual ele ocorre (Lyssimachou et al., 2008). Alguns estudos relacionam o imposex com a inibição da enzima aromatase do citocromo P450 (Nakanishi, 2008). Esta

enzima tem como função a conversão de testosterona em 17β -estradiol. A inibição desta enzima, portanto, levaria a um aumento de testosterona nas fêmeas com consequente surgimento de caracteres sexuais masculinos como ducto deferente e pênis (Leung et al., 2006). Este fenômeno também já foi observado em peixes (Shimasaki et al., 2003). Entretanto, sugere-se que este mecanismo seja ainda mais complexo (Oberdörster et al., 2005).

Triorganoestânicos apresentam características de desreguladores endócrinos (Snoeijs et al., 1987; Fent, 1996). São classificados como desreguladores endócrinos os compostos exógenos com potencial para interagir com sítios receptores de hormônios ou alterar o sistema endócrino, independentemente se atuam diretamente no sítio receptor ou não. Essa interferência pode afetar a função reprodutiva e metabólica de animais e seres humanos (Bila e Dezotti, 2007). A exposição aos compostos organoestânicos induz modificações fisiológicas como prejuízos no metabolismo e ação dos hormônios sexuais em roedores (Omura et al., 2001; Grote et al., 2004; Kishta et al., 2007) além da modificação na função endócrina de mamíferos, como o pâncreas, pituitária, gônadas (masculina e feminina) e a tireóide quando são expostas ao TBT (Wada et al., 1982; Oberdörster et al., 1998; Vos et al., 2000; Merlo et al., 2016). Disfunções reprodutivas, como alteração no ciclo estral de ratas e modificações na morfofisiologia do ovário (Delgado Filho et al., 2011; Podratz et al., 2012; Graceli et al., 2012), também foram associados à exposição ao TBT.

Outro efeito desses compostos está relacionado a uma desregulação metabólica em modelos de mamíferos, levando a um aumento da deposição lipídica, estimulando o tecido adiposo branco com consequente modulação de fatores relacionados com o surgimento da obesidade *in vivo* e *in vitro* (Grun e Blumberg, 2007; Casals-Casas et al., 2008; Grun e Blumberg, 2006). Esses resultados sugerem que os compostos à base de estanho podem agir como fatores “obesogênicos”, aumentando a incidência de obesidade ou outras desordens metabólicas relacionadas.

Além dos efeitos endócrinos, a exposição ao TBT está associada com o aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} . Estudos anteriores mostraram que 5 minutos foi tempo suficiente para aumentar a $[Ca^{2+}]_i$ de maneira concentração dependente de TBT em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano e o aumento de Ca^{2+} foi bloqueado por dantrolene, um antagonista de RyR2 (Isomura et al., 2013). O aumento da $[Ca^{2+}]_i$ também foi já evidente 5 minutos após o tratamento com TBT em timócitos de ratos isolados e este aumento foi

seguido por uma geração dependente (dose e tempo) de EROs ao nível mitocondrial (Gennari et al., 2000).

Numerosos estudos indicam que os compostos organoestânicos possuem uma alta especificidade de ação e produzem efeitos neuro-, cito- e genotóxicos em vários sistemas e entre esses efeitos pode-se citar a inibição da fosforilação oxidativa (Aldridge et al., 1977), lesões no sistema nervoso central (Magee et al., 1957) e depressão da imunidade dependentes do timo (Miller et al., 1980). Além destes efeitos, os compostos organoestânicos também têm se mostrado capazes de afetar o heme metabolismo, assim como o sistema cardiovascular (Rosenburg et al., 1981; Nath, 2008).

1.6 Efeitos Vasculares

Solomon and Krishnamurty (1992) demonstraram que a incubação de anéis de aorta de ratos de ambos os gêneros com TBT nas concentrações 10^{-6} e 10^{-7} M por 1 h não interferiu na contração e no relaxamento deste vaso. Em contrapartida, os experimentos de Mizuhashi et al. (2000) com preparação de aorta demonstraram que o TBT (10^{-6} M) possui ação bidirecional, causando tanto contração como relaxamento da aorta de ratos.

O tratamento com TBT (500 ng / kg) durante 15 dias foi reportado pelo nosso grupo por alterar parâmetros morfo-fisiológicos de artérias de resistência mesentérica de terceira ordem. Nesse estudo o TBT promoveu diminuição da luz e diâmetros externos, diminuição da distensibilidade, aumento da rigidez e da deposição de colágeno nessas artérias de resistência. A exposição ao TBT também aumentou a resposta contrátil induzida pela fenilefrina nos vasos estudados (Ribeiro Junior, 2016). O trabalho publicado por Rodrigues et al. (2014) mostrou que o tratamento por 15 dias com 100 ng/Kg de TBT reduziu a reatividade vascular à fenilefrina, um agonista α -adrenérgico, em anéis isolados de aorta bem como levou ao aumento da deposição de colágeno entre as membranas elásticas da aorta e também elevou a liberação de EROs.

Em estudo publicado por Dos Santos et al. (2012), os autores mostraram que o tratamento com TBT prejudicou a resposta vasodilatadora induzida pelo 17β -estradiol em artérias coronárias de ratas. O efeito vasodilatador foi mediado tanto por um mecanismo direto no músculo liso vascular quanto indireto, via endotélio, nos grupos controle e tratado com TBT.

Os autores mostraram que a pressão de perfusão coronariana basal foi maior nos grupos tratados com TBT em corações isolados pela técnica de Langendorff.

1.7 Efeitos cardíacos

Poucos trabalhos mostram os efeitos do TBT sobre a contratilidade cardíaca. No entanto, evidências indicam que os compostos organoestânicos podem inibir a atividade da Mg^{2+} ATPase e Ca^{2+} ATPase em mitocôndrias cardíacas (Mehrotra et al., 1985) interferindo assim na síntese de ATP, além de diminuir a atividade da bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA) (Kodavanti et al., 1991) e a bomba de Na^+/K^+ (Cameron et al., 1991). Estes estudos indicam que os compostos triorganoestânicos podem afetar o bombeamento de Ca^{2+} por meio da alteração na fosforilação de proteínas importantes envolvidas no funcionamento cardíaco bem como podem interferir na produção de ATP e, portanto, podem interferir na função cardíaca.

1.8 Acoplamento Excitação-Contração Cardíaco

O mecanismo de acoplamento excitação-contração cardíaco (AECC) compreende os processos de ativação elétrica dos miócitos que desencadeiam a contração do coração (figura 1). Sabe-se que o Ca^{2+} desempenha um papel fundamental no AECC. Durante o potencial de ação cardíaco, o Ca^{2+} entra na célula através do canal tipo L e promove a chamada liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) via receptor de rianodina (RyR2) para amplificar a concentração de Ca^{2+} . O resultado do aumento $[Ca^{2+}]_i$ é a ativação da contração cardíaca (Bers, 2002).

A base molecular da ativação de RyR2 por Ca^{2+} não está completamente elucidada (Li e Chen, 2001). Uma das hipóteses é que ocorre a interação entre as proteínas calsequestrina, junctina e triadina na mediação dos efeitos do Ca^{2+} sobre RyR2 (Ikemoto et al., 1989; Donoso et al., 1995; Zhang et al., 1997; Shin et al., 2000). Gyork et al, 2004 concluíram que a calsequestrina serve com um sensor luminal de Ca^{2+} enquanto a junctina e a triadina são necessárias para ligar fisicamente a calsequestrina a RyR2. Baixas concentrações de Ca^{2+} inibem o complexo do canal RyR2 através de fortes interações com a junctina e triadina. Com o aumento da concentração de Ca^{2+} essa inibição é gradualmente diminuída à medida que os locais de ligação de Ca^{2+} na calsequestrina se tornem cada vez mais ocupados com Ca^{2+} e as

interações entre a calsequestrina-junctina-triadina enfraquecem permitindo então atividade do canal.

No interior da célula miocárdica, o Ca^{2+} se liga as proteínas contráteis para que ocorra a contração. O Ca^{2+} se liga à troponina C (TnC) fazendo com que a tropomiosina deixe de bloquear o sítio de ligação entre actina e miosina. A actina apresenta sítios ativos que são capazes de interagir com a miosina e para acontecer essa interação a atividade ATPásica da miosina é ativada, quebrando ATP em ADP e Pi e liberando energia necessária para o deslizamento dos miofilamentos, ocasionando a contração muscular. Então, a afinidade do Ca^{2+} à TnC é um dos fatores que modula a força de contração miocárdica (Vassallo et al., 2008).

Existem duas formas principais de alterar a força de contração: alterando a amplitude ou duração do transiente de Ca^{2+} e alterando a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} . A sensibilidade dos miofilamentos é aumentada dinamicamente pelo estiramento dos miofilamentos resultando em uma maior força de contração. Este mecanismo está relacionado em parte ao fato de o estiramento promover uma melhor interação entre os filamentos de actina e miosina e é um importante mecanismo auto regulatório pelo qual o coração se ajusta a alterações de enchimento ventricular (Lei de Frank Starling) (Starling e Visscher, 1927).

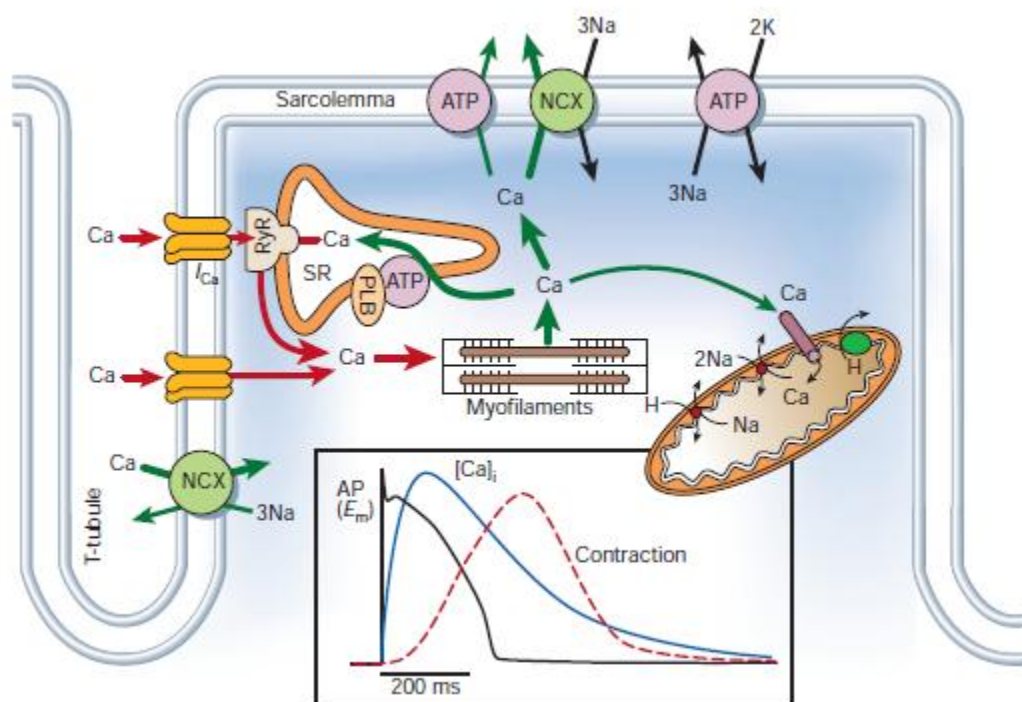


Figura 1 Representação esquemática do transporte de Ca^{2+} no acoplamento excitação-contracção cardíaca. SR: retículo sarcoplasmático, ATP: ATPase, PLB: fosfolamban, NCX: trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, RyR: receptor de Rianodina, AP: potencial de ação, I_{Ca} : corrente de Ca^{2+} . Bers, 2002.

Para que ocorra o relaxamento do músculo cardíaco é necessário que o Ca^{2+} se desligue TnC e seja removido para o meio extracelular e para o RS que é um local de armazenamento deste íon. O transporte de Ca^{2+} para fora do citoplasma envolve a participação SERCA2a, do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e da bomba de Ca^{2+} do sarcolemma. Alterações nos mecanismos de extrusão de Ca^{2+} também podem modificar a contratilidade já que interferem na concentração intracelular deste íon (Bers, 2002).

A SERCA2a desempenha um papel central na contratilidade miocárdica. Ela transporta activamente Ca^{2+} para o RS e regula a concentração de Ca^{2+} citosólica. A proteína fosfolamban (PLB) é um regulador da SERCA2a. Tem sido bem documentado que a fosforilação do PLB na Ser-16 e Thr-17 pelas cinases PKA e CAMKII, respectivamente, pode aumentar a atividade da SERCA2a. Portanto, o transporte de Ca^{2+} pelo RS cardíaco tem um papel chave no acoplamento excitação-contracção do miocárdio, onde a liberação de Ca^{2+} do RS induz a contracção e o re-acúmulo de Ca^{2+} pelo RS levando ao relaxamento (Bers, 2002).

A liberação sincronizada de Ca^{2+} pelo RS é fundamental para o funcionamento normal do cardiomiócito a qual é cessada durante a diástole. No entanto, também ocorrem outros eventos de liberação de cálcio durante a diástole conhecidos como sparks de Ca^{2+} e ondas de Ca^{2+} . Os eventos de liberação espontânea de Ca^{2+} , os sparks de Ca^{2+} são liberações diastólicas de Ca^{2+} de aberturas estocásticas de agrupamentos de RyR2 individuais e na maioria dos casos, são totalmente independentes do influxo de Ca^{2+} local. A liberação de Ca^{2+} pelo RS pode ser estudada por meio de agentes fluorescentes sensíveis ao Ca^{2+} , como o Fluo4 utilizando a técnica de microscopia confocal (Niggli, 1999; Bers, 2002). O vazamento de Ca^{2+} do RS é importante porque pode levar a redução do Ca^{2+} disponível no RS para liberação durante a sístole. Como consequência poderia haver disfunção sistólica e elevação da $[\text{Ca}^{2+}]$ i diastólico contribuindo assim para a disfunção diastólica e ao aparecimento de arritmias. Além disso esses eventos são energeticamente dispendiosos devido a necessidade de utilizar ATP extra para recaptar o Ca^{2+} .

1.9 Espécies reativas de oxigênio e contratilidade miocárdica

O coração apresenta uma alta demanda energética de modo que a contínua produção de ATP pela mitocôndria é importante para manter a contratilidade, os processos de metabolismo basal bem como a homeostase iônica (Lopaschuko et al., 2010). A produção de ATP envolve as etapas de glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa. A transferência de elétrons, associada ao bombeamento de prótons, produz um gradiente eletroquímico na membrana mitocondrial que promove a síntese de ATP e este processo requer a participação do oxigênio. Portanto, existe uma importante relação entre função mitocondrial e função cardíaca. Além disso, a redução do oxigênio durante o transporte de elétrons pela cadeia respiratória mitocondrial, constitui uma importante fonte das chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs) (Blajszczak e Bonini, 2017)

As EROs são produzidas em condições fisiológicas em reações que envolvem transferência de elétrons. O ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila são os principais metabólitos do oxigênio. A produção de EROs no coração ou em outro tecido é balanceada pela atividade de diversas enzimas antioxidantes. O estresse oxidativo ocorre quando a produção de EROS supera a capacidade do sistema antioxidante das células (Mcmurray et al., 1993).

A enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase)- participa da cascata respiratória celular e catalisa a redução de um elétron do oxigênio molecular formando assim $O_2^{\bullet-}$ que é dismutado (convertido) em H_2O_2 e O_2 em uma reação catalisada pela superóxido dismutase (SOD) (Kondo et al., 2012), sendo que esta é uma importante via antioxidante. O H_2O_2 gerado, por sua vez, sofre atuação da catalase a qual atua produzindo duas moléculas de água e uma de oxigênio. Fatores hormonais, como por exemplo, a angiotensina II (Angio II), podem gerar alterações na mobilidade de Ca^{2+} e quadros inflamatórios, além da ativação da NADPH oxidase e consequentemente, induzir estresse oxidativo (Lenarczyk et al., 2009; Nistala et al., 2009).

Muitos estudos vêm demonstrando que a exposição ao TBT induz ao aumento da geração de EROs com subsequentes danos oxidativos em diversos sistemas fisiológicos como o vascular, neural, reprodutivo, imunológico, células linfócitos-T e neuroblastoma em modelos in vivo e in vitro (Ishihara et al. 2012; Katika et al., 2011; Kato et al., 2013; Isomura et al., 2013; Mitra et al., 2014; Rodrigues et al., 2014; Nishimura et al., 2015; Ximenes, 2016)

As EROs são capazes de prejudicar a contratilidade através de diferentes mecanismos, incluindo alterações no processo de AECC. As EROs podem oxidar proteínas importantes que regulam a contratilidade como RyR2. A ativação oxidativa de RyR2 pode ser importante em termos de regulação da contração cardíaca bem como do relaxamento, uma vez que a ativação de RyR2 influencia a concentração local de Ca^{2+} citosólica. A exposição de cardiomiócitos a OH^\bullet e H_2O_2 é capaz de reduzir o transiente de Ca^{2+} e alterar a sensibilidade ao Ca^{2+} disponível (Gill et al., 1995).

No AECC as EROS tem um importante impacto em várias proteínas chave na regulação de íons, como por exemplo, CaMKII, PKA ou PKC (figura 2). As EROs podem ser prejudiciais quando produzidas em excesso devido a um desequilíbrio no transporte de íons como Na^+ e Ca^{2+} , podendo resultar em sobrecarga destes íons, perda de Ca^{2+} do RS e disfunção contrátil (Kohler et al., 2014).

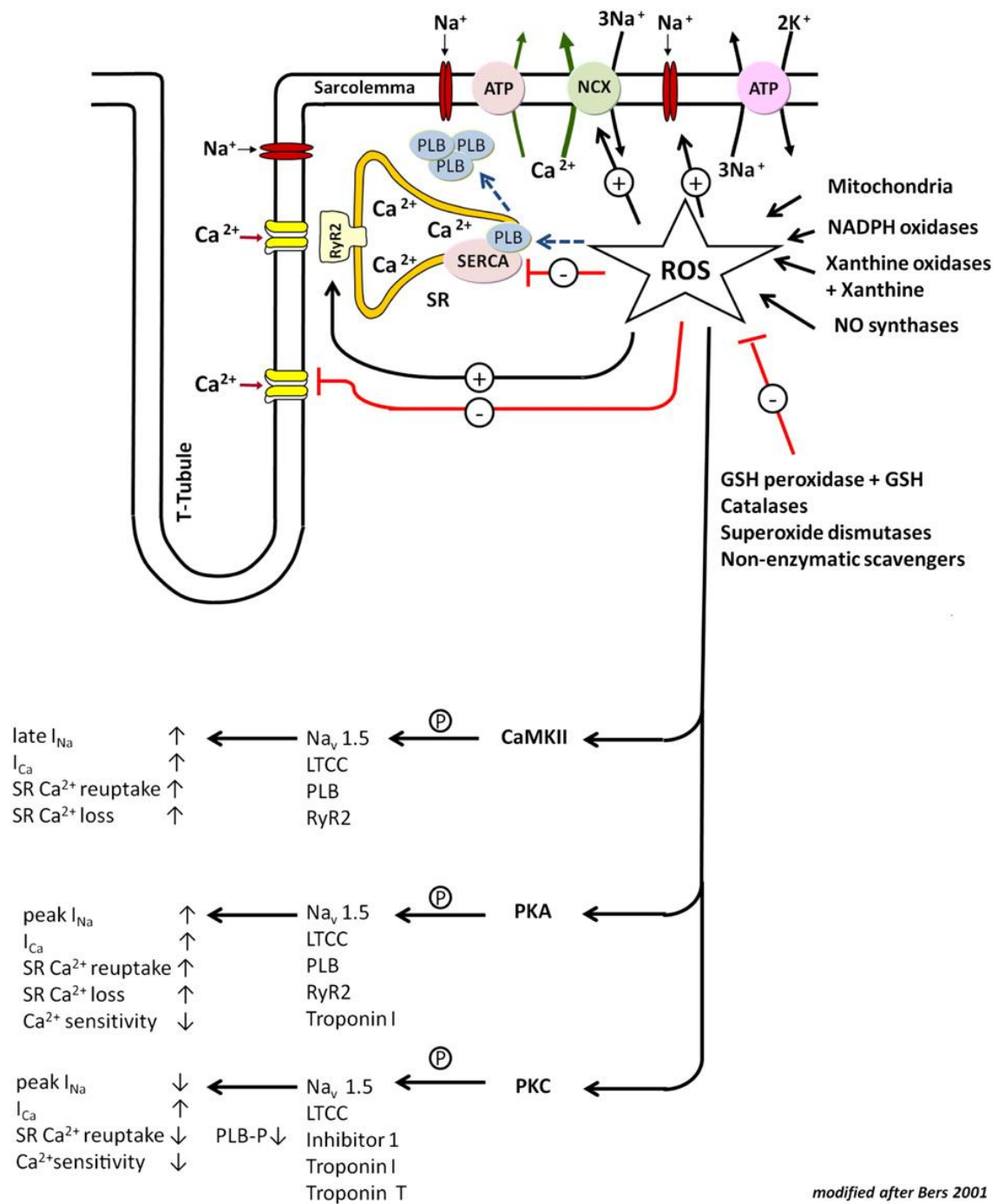


Figura 2 Influência das EROs no AECC por várias vias. Modificado de Kohler et al., 2014.

Os trabalhos presentes na literatura demonstram que o TBT tem um importante potencial citotóxico para diversos órgãos, incluindo interferência no desenvolvimento sexual e reprodutivo, desregulação endócrina, alteração na concentração citosólica de Ca^{2+} e alterações vasculares. No entanto, são escassos os trabalhos que descrevem a ação cardiotóxica do TBT. Diante do exposto, o presente estudo visa analisar os efeitos da toxicidade aguda do TBT sobre a contratilidade miocárdica.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos agudos do tributilestanho (50 μM) sobre a contratilidade cardíaca de ratas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Protocolos experimentais

3.1.1 Avaliação do efeito agudo do TBT em músculo papilar

Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) pesando entre 200 e 250 gramas. Esses animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e foram mantidos em gaiolas com livre acesso à água e ração, sob controle da temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Utilização de Animais da UFES (27/2016 CEUA UFES).

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (40 mg/Kg) e xilazina (8 mg/Kg) e posteriormente foram submetidos à toracotomia, o coração foi removido e perfundido retrogradamente através do coto aórtico com solução nutritiva para permitir adequada dissecação dos músculos papilares da parede anterior e posterior do ventrículo esquerdo (VE). Os músculos papilares foram fixados por argolas de modo que a extremidade superior foi conectada por anel e fio de aço inoxidável a um transdutor de força isométrica (TSD125 - Biopac Systems, Inc; CA) e o anel da extremidade inferior do músculo conectado a um gancho fixo na cuba de vidro contendo 20 ml de solução de Krebs-Henseleit gaseificada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂), contendo pH 7.4 a temperatura de 37° C. O transdutor foi conectado a um microcomputador dotado do software AcqKnowledge® 3.7.5. (Biopac Systems Inc., CA, USA) 34 que permitia determinar os valores de força de contração isométrica. Paralelamente ao músculo, posicionam-se dois eletrodos de prata acoplados a estimulador elétrico que liberam estímulos em onda quadrada de 5 milissegundos de duração voltagem. Todos os músculos foram estimulados em frequência de 0,5 Hz. Após o período de estabilização foram medidas a força isométrica desenvolvida e o TBT foi adicionado na cuba em concentrações crescentes de 10⁻⁹M até 10⁻²M. O tempo de incubação foi de 3 minutos entre uma dose e outra.

3.1.2 Avaliação dos parâmetros cardíacos em corações isolados e perfundidos pela técnica de Langendorff

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (40 mg/Kg) e xilazina (8 mg/Kg). Depois de devidamente anestesiadas o coração foi retirado e perfundido retrogradamente através da aorta com solução Krebs-Henseleit com o fluxo constante de 10 mL/min, de acordo com a técnica de Langendorff. A solução de Krebs-Henseleit (KH) é composta por NaCl 120 mM, CaCl₂ 1,26 mM, KCl 5.4 mM, MgSO₄ 2,5 mM, NaH₂PO₄ 2 mM, NaHCO₃ 18 mM, Na₂SO₄ 1,2 mM, EDTA 0,03 mM e glicose 11 mM), tem pH (7.4) e aeração mantidos pelo borbulhamento de mistura gasosa contendo 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico e temperatura controlada em 37 °C por meio de um banho-maria circulante.

A exposição aguda ao TBT foi feita adicionando-se TBT (50μM) na solução de Krebs-Henseleit durante 5 minutos. O TBT estava previamente diluído em etanol 0.4%. Os animais experimentais foram agrupados aleatoriamente em: coração não exposto à solução contendo TBT (Grupo Controle) e coração exposto por 5 minutos à solução de TBT (Grupo TBT).

A pressão de perfusão coronariana (PPC) foi medida por um transdutor de pressão (TSD 104A- Biopac conectado a um pré-amplificador Funbec MP-100) ligado ao sistema de perfusão. A PPC é o produto da resistência coronariana pelo fluxo coronariano. Como o fluxo é mantido constante, mudanças na pressão coronariana podem ser diretamente relacionadas a alterações na resistência da circulação coronariana. Após a perfusão com TBT, o átrio esquerdo foi aberto e um balão de látex preenchido com água, conectado a um transdutor de pressão (TSD 104A- Biopac conectado a um pré-amplificador Funbec MP-100), foi introduzido na cavidade ventricular esquerda para controle da pressão diastólica (PD) e mensuração da pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE) e de suas derivadas temporais positiva e negativa (dP/dt+ e dP/dt -). O transdutor era mantido conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems: Inc; CA) e esses registros foram obtidos em computador pelo software Biopac Student Lab com taxa de amostragem de 2000 amostras / segundo.

3.1.3 Protocolo experimental durante a perfusão do coração isolado

As curvas de função ventricular foram obtidas por meio da medida da pressão PSIVE enquanto se variava a PD de 0 a 30 mmHg em intervalos de 5 mmHg (figura 3). Para a avaliação da resposta inotrópica ao Ca^{2+} , a PD era mantida em 10 mmHg e a PSIVE era registrada enquanto o coração era perfundido com diferentes concentrações de Ca^{2+} : 0,62; 1,25; 1,87; 2,5 e 3,12 mM (figura 4). A resposta dos receptores β -adrenérgicos foi avaliada mantendo-se a PD em 10 mmHg enquanto administrava-se uma única dose de 100 μl de Isoproterenol a 10^{-4} M.

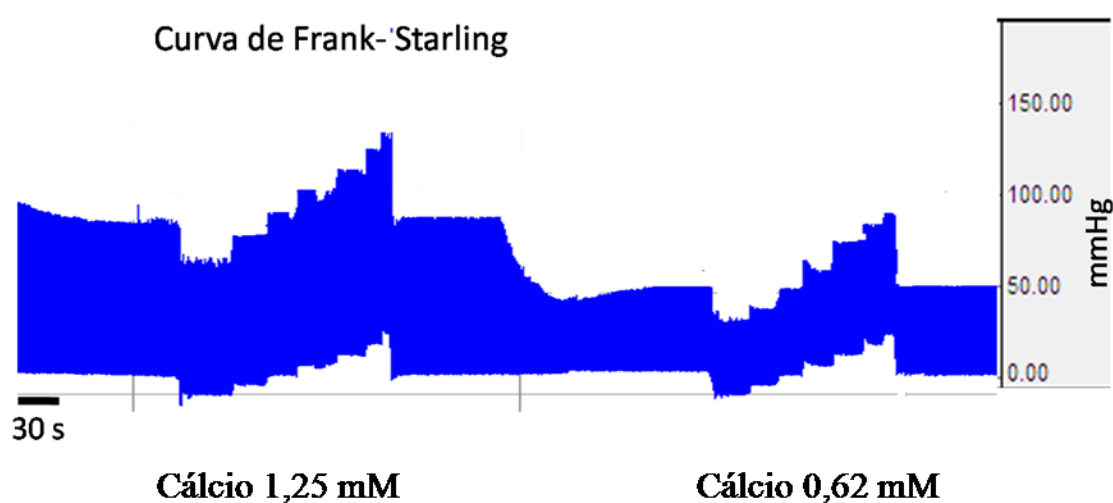


Figura 3 Registro representativo da curva de Frank Starling, onde foram medidas as variações da pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE mmHg) nas concentrações de Ca^{2+} de 0,62 e 1,25 mM para os aumentos crescentes da pressão diastólica do ventrículo esquerdo (PD) de 0 até 30 mmHg em intervalos de 5 mmHg.

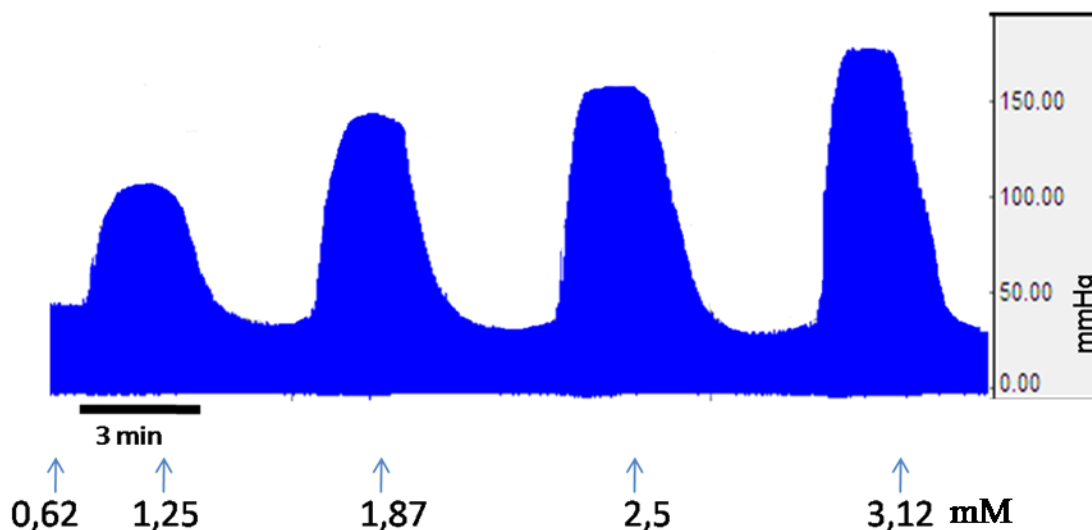


Figura 4 Registro representativo do efeito inotrópico positivo em concentrações crescentes de Ca^{2+} extracelular (0,62; 1,25; 1,87; 2,5 e 3,12 mM)

3.2. Avaliação do estresse oxidativo miocárdico

3.2.1 Papel das EROs nos efeitos agudos do TBT sobre a contratilidade do músculo cardíaco

Para avaliar a participação de EROs nos efeitos do TBT sobre a contratilidade miocárdica, os corações foram perfundidos na presença dos seguintes antioxidantes:

- Tiron (500 μM): varredor de anion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)
- Tempol (100 μM): mimético da enzima superóxido dismutase
- Apocinina (100 μM): um inibidor seletivo da NADPH oxidase, uma das principais enzimas formadoras de radicais livres
- Losartan (10 μM): bloqueador do receptor AT1

3.2.2 Avaliação “in situ” do $\text{O}_2^{\bullet-}$ pela técnica de fluorescência com dihidroetídio

A fluorescência oxidativa ao dihidroetídio (DHE) foi utilizada para avaliar a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ in situ, e os procedimentos se seguiram como previamente descrito (Nunes et al., 2014). O

DHE é um derivado do etídio que em contato com o $O_2^{\bullet-}$ oxida-se e posteriormente se liga ao DNA das células emitindo fluorescência vermelha. Ao final de cada experimento com corações isolados, tiras da parede livre do ventrículo esquerdo com aproximadamente 5 mm de comprimento foram cortadas e imersas em solução nutritiva de Krebs com tampão - HEPES na presença de 20% de sacarose durante uma hora. O tecido foi armazenado em meio de inclusão para criostato a $-80^{\circ}C$ até o momento de realização dos cortes. As secções do músculo cardíaco medindo 10 μm de espessura foram obtidas com o auxílio de um criostato e colocadas em lâminas gelatinizadas, congeladas até o momento do protocolo com DHE. As lâminas foram mantidas em estufa a $37^{\circ}C$ por uma hora para retirar o meio de inclusão. A seguir as secções foram incubadas com solução tampão de Krebs-HEPES contendo DHE (2 μM) em câmara úmida e protegida da luz, à temperatura de $37^{\circ}C$ por 30 min. Após este período as lâminas foram montadas com meio de montagem (Erv-Mount, Easy Path) e a lamínula foi inserida sobre as amostras na lâmina. As imagens das secções de coração foram detectadas com microscópio de fluorescência invertido (Leica DM 2500) usando filtro 568 nm, no aumento de 10x e fotografadas com a câmera acoplada ao microscópio (Leica DFC 310 FX). A densidade de fluorescência média foi calculada usando o software Image J. Também foi feita a medição da produção in situ $O_2^{\bullet-}$ in vitro em tiras de VE de aproximadamente 5 mm de comprimento expostas por 15 minutos ao TBT (50 μM) e aos antioxidantes Tiron (500 μM), Tempol (100 μM) e Losartan (10 μM). O protocolo foi semelhante ao descrito acima.

3.2.3 Medição dos *sparks*, conteúdo e transiente de Ca^{2+} do RS em cardiomiócitos

Ratos Wistar machos pesando 250 ± 15 g com 2,2 meses de idade foram anestesiados com isoflurano. Após a toracotomia, os corações foram rapidamente retirados, montados em um aparelho de Langendorff e perfundidos com solução contendo colagenase a $37^{\circ}C$. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de laboratório e foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso Animal aprovado pela Universidade da Califórnia em Davis.

3.2.3.1 Cardiomiócitos Permeabilizados: análise dos *Sparks* de Ca^{2+}

As análises dos *sparks* em cardiomiócitos ventriculares enzimaticamente dissociados, foram realizadas em células permeabilizadas. As células foram plaqueadas em lamínulas revestidas com 5 uL de laminina (natural mouse laminina Invitrogen 1,20 mg/mL) durante 20 minutos. Os cardiomiócitos intactos foram suspensos em solução interna contendo (em mM) aspartato de potássio, 0,5 EGTA, 1,0 MgCl_2 , dextran 8 %, 1,0 ATP-2Na, 5,0 glutatona redutase, 10,0 creatina fosfoquinase, CaCl_2 para alcançar Ca^{2+} livre 50 nM calculadas com WinMAXC 2.05, Stanford University) e 10 HEPES (pH ajustado para 7,2 com KOH 0.1 M) e colocado na câmara de vidro descartável (volume final=50 μL) durante 15 min. A membrana celular foi permeabilizada pela adição de saponina 10 nM (Saponina from Quillaja Bark Purified –Sigma) durante 30 s. Após 30 s, a solução do banho foi trocada por uma solução interna sem saponina bem como 5 U/ml de creatina fosfoquinase, 8% de dextrano (peso molecular = 40000) e 0,04 mM de sal de fluo4 pentapotássio (F4-5) (Invitrogen), pH 7,2 com KOH. As concentrações livres de Ca^{2+} e Mg^{2+} desta solução foram de 50 nM e 1 mM, respectivamente (calculadas com WinMAXC 2.05, Stanford University).

Os *sparks* de Ca^{2+} foram gravados com um microscópio confocal de varredura a laser no modo de varredura colocado paralelamente ao eixo longitudinal da célula em um plano focal central (Radiance 2000 / MP, Bio-Rad; velocidade de digitalização 332 linhas / S, tamanho de pixels = 0,12 μm). O F4-5 foi excitado em 488 nm com laser de íon de argônio, e a fluorescência foi medida em comprimentos de onda > 515 nm. Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente de 25° C. A análise dos *sparks* foi feita na presença de TBT nas concentrações de 10^{-8} e 10^{-7}M .

3.2.3.2 Cardiomiócitos Intactos: medida do conteúdo de Ca^{2+} do RS usando Cafeína 10 mM

Para determinação do estoque de Ca^{2+} do RS os cardiomiócitos ventriculares foram carregadas com o indicador de Ca^{2+} por 20 minutos de incubação em solução de Tyrode normal contendo 10 μmol de Fluo 4-AM (Invitrogen) à temperatura ambiente. As células foram então plaqueadas em lamínulas revestidas com 5 uL de laminina (natural mouse laminina Invitrogen 1,20 mg/mL) durante 20 minutos com solução de Tyrode em mM: 140 NaCl, 4 KCl, 1,2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 glicose e 5 HEPES, pH ajustado para 7,4 com solução de NaOH 0,1 M. Os cardiomiócitos foram estimulados eletricamente 7 vezes a 0,5 Hz. Em

seguida, a estimulação elétrica era cessada e a célula era perfundida em uma solução de 10 mM de cafeína. Dessa imagem, era extraída a relação da variação da intensidade de fluorescência máxima pela fluorescência basal (F/F_0), sendo esse índice um indicador do estoque intracelular de Ca^{2+} do RS. As medidas foram realizadas na presença de TBT nas concentrações de 10^{-8} e 10^{-7} M e também na presença de Dantrolene 10 μ M, um bloqueador de RyR2.

3.2.3.3 Análise do transiente de Ca^{2+}

Para determinação do transiente de Ca^{2+} as células foram carregadas com o indicador de Ca^{2+} por 20 minutos de incubação em solução de Tyrode contendo 10 μ mol de Fluo 4-AM (Invitrogen) à temperatura ambiente. Os cardiomiócitos foram estimulados eletricamente 7 vezes a 0,5 Hz, 30 V usando um par de eletrodos de platina inseridos paralelo ao cardiomiócito. As medidas do transiente foram realizadas na presença de TBT nas concentrações de 10^{-8} e 10^{-7} M e também na presença de ORM10962 (500 nM) um bloqueador do trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX).

3.3. Drogas e reagentes

Ácido clorídrico – HCl (Merck)
Apocinina (Sigma)
Aspartato de potássio
Bicarbonato de sódio - $NaHCO_3$ (Merck)
Cafeína (Sigma)
Cloreto de cálcio dihidratado - $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Merck)
Cloreto de magnésio Hexahidratado - $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Merck)
Cloreto de potássio - KCl (Merck)
Cloreto de sódio - NaCl (Vetec)
Creatina fosfoquinase (Sigma)
Dantrolene(Sigma)
Dihidroetidio (Sigma)
Dextran (Sigma)
Etanol absoluto (Sigma)
EDTA (Sigma)
Fluo 4 (Invitrogen)
Fluo 4 $5K^+$ (Invitrogen)
Fosfato de sódio monobásico - NaH_2PO_4 (Merck)

Glicose (Vetec)
Glutation redutase (Sigma)
HEPES (Sigma)
Hidróxido de Sódio (Merck)
KH₂PO₄ (Merck)
Laminina (Invitrogen)
L-isoproterenol (Sigma)
ORM-10962 Bloqueador do trocador Na-Ca [2-(4-hydroxypiperidin-1-yl)-N-(6-((2-phenylchroman-6-yl)oxy)pyridin-3-yl)acetamide] (Toronto Research Chemicals)
Tempol (Santa Cruz Biotechnology)
Tiron (Sigma)
Sacarose (Vetec)
Saponina (Sigma)

3.4 Análise Estatística

Os dados foram expressos como Média±EPM e a significância foi avaliada utilizando Teste t Student monocaual ou ANOVA duas vias com post hoc de Tukey, sendo que $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significante. Para a análise estatística e construção dos gráficos foi utilizado o programa *GraphPadPrism* versão 6.01.

Os Sparks de cálcio foram analisados usando o programa Spark Master. O conteúdo de Ca²⁺ do RS e o transiente foram analisados usando o programa ImageJ

4. RESULTADOS

4.1 Efeito Agudo do TBT sobre o Músculo Papilar

O efeito de concentrações crescentes de TBT (10^{-9} a 10^{-2} M) sobre a força ativa desenvolvida pelos músculos papilares está ilustrado na figura 5. O TBT produziu uma intensa e rápida resposta inotrópica negativa nos músculos papilares. Na concentração de 10^{-2} M não houve mais resposta contrátil nos músculos.

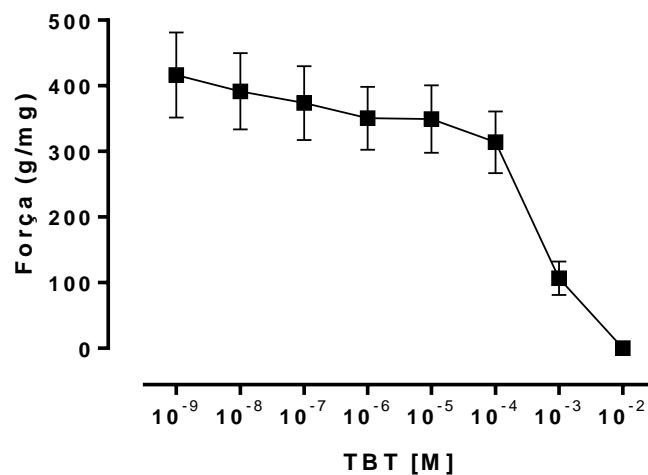


Figura 5 Efeito de concentrações crescentes de TBT (10^{-9} – 10^{-2} M) no desenvolvimento de força ativa nos músculos papilares isolados contraindo isometricamente. Cada condição foi mantida por 3 minutos (n=5). Dados expressos como Média \pm EPM.

4.2 Efeito agudo do TBT 50 μ M sobre o coração isolado

Os mecanismos que determinam o desempenho do coração isolado podem envolver a regulação heterométrica (mecanismo de Frank Starling) e a regulação homeométrica como ocorre pela ativação dos receptores β adrenérgicos. Esses parâmetros foram avaliados no presente estudo em corações isolados usando a técnica de Lagendorff.

Para investigar os efeitos do TBT sobre a responsividade ao Ca^{2+} , foi realizada uma curva concentração-resposta frente a concentração crescente de Ca^{2+} extracelular. A figura 6A mostra uma menor resposta contrátil dos corações perfundidos com TBT quando comparados com o grupo Controle para concentrações de Ca^{2+} acima de 1,25 mM. Similarmente, também houve redução na $dP/dt+$ (figura 6 B) embora a $dP/dt-$ tenha sido reduzida apenas quando analisada em termos percentuais (figura 6C).

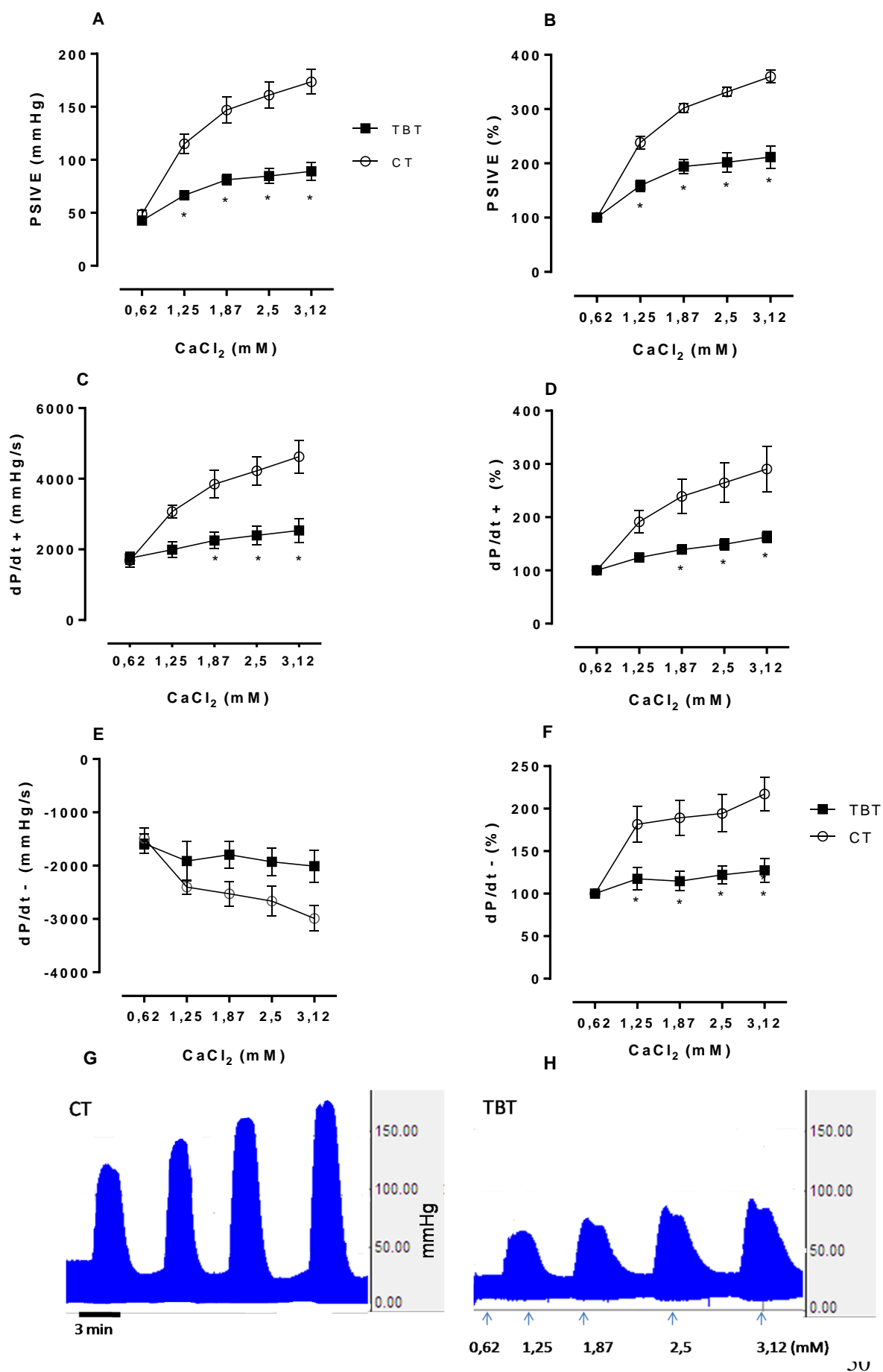


Figura 6 Resposta inotrópica positiva frente ao aumento de Ca^{2+} extracelular de 0,62 até 3,12 mM. A: Curva de Ca^{2+} dos grupos Controle (n=7) e TBT (50 μM , n=8) B: Valores percentuais da curva de Ca^{2+} ; C: Primeira derivada positiva ($dP/dt +$) D: Valores percentuais da $dP/dt +$, E: Primeira derivada negativa ($dP/dt -$) F: Valores percentuais da $dP/dt -$; G: Registro representativo do grupo Controle e H: Registro representativo do grupo TBT. Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias.* $p < 0,05$ vs Controle.

Para avaliar se o efeito inotrópico negativo do TBT na resposta ao aumento extracelular de Ca^{2+} envolve a participação das EROs, os corações foram perfundidos com solução nutritora contendo os antioxidantes: tiron, tempol e apocinina e o bloqueador do receptor de angiotensina II losartan. Como visualizado na figura 7 apenas o antioxidante tiron reverteu o efeito inotrópico negativo induzido pela perfusão com TBT.

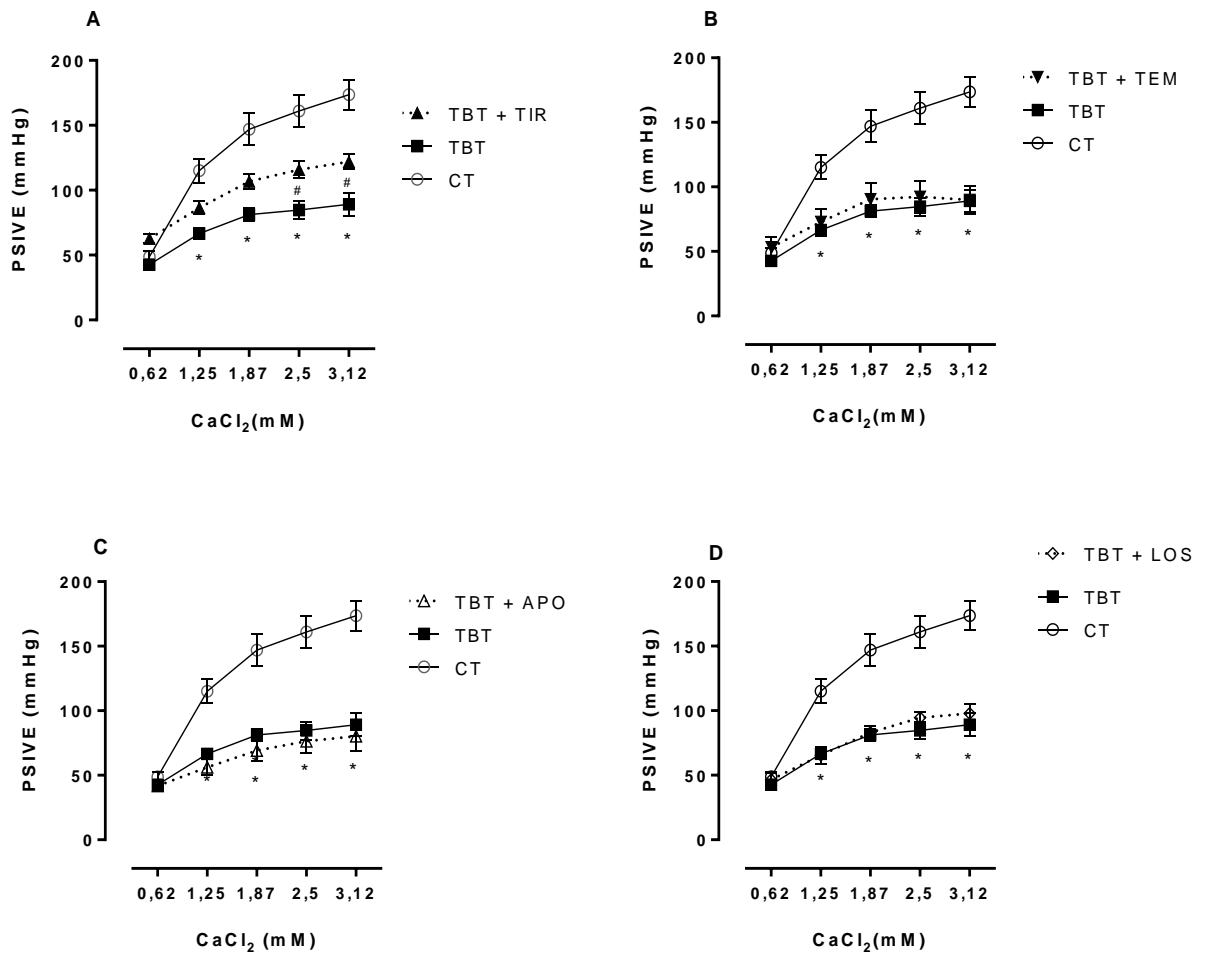


Figura 7 Efeitos dos antioxidantes sobre a resposta inotrópica ao Ca^{2+} . A: Grupos Controle (n=7), TBT (50 μM) (n=8) e TBT + Tiron (500 μM) (n=5) B: Grupos Controle, TBT e TBT + Tempol (100 μM) (n=5) C: Grupos Controle, TBT e TBT + Apocinina (30 μM) (n=4) e D: Grupo Controle, TBT e TBT + Losartan (10 μM) (n=4). Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias. * $p < 0,05$ vs Controle, # $p < 0,05$ vs TBT.

A figura 8 mostra a curva de função ventricular com solução de Krebs contendo Ca^{2+} 1,25 mM. A presença do TBT determinou uma significativa redução da PSIVE frente ao aumento da PD. A perfusão conjunta de TBT com o antioxidante tiron reverteu essa resposta nas PD menores ou igual a 10 mmHg evidenciando assim a participação das EROs nesta menor resposta quando os corações são perfundidos com TBT. Entretanto, diferentemente do tiron, os outros antioxidantes não foram capazes de reverter a contratilidade.

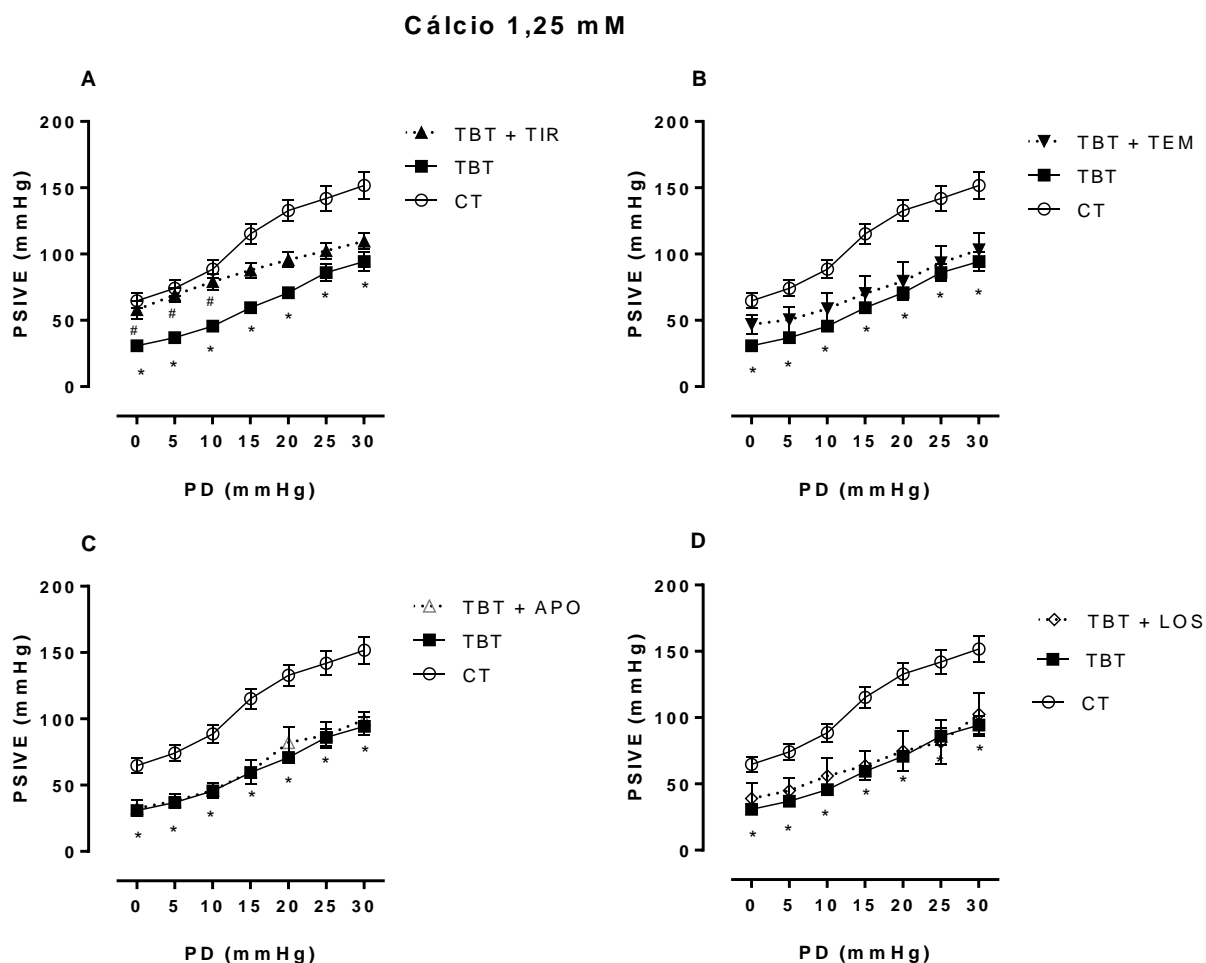


Figura 8 Curva de função ventricular: Pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE) e pressão diastólica (PD) em cálcio 1,25 mM; A: Grupos Controle (n=7), TBT (50 μM) (n=8) e TBT + Tiron (500 μM) (n=5) B: Grupos Controle, TBT e TBT + Tempol (100 μM) (n=5) C: Grupos Controle, TBT e TBT + Apocinina (30 μM) (n=4) e D: Grupo Controle, TBT e TBT + Losartan (10 μM) (n=4). Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias.* $p < 0,05$ vs Controle ; # $p < 0,05$ vs TBT.

Na curva de função ventricular com 0,62 mM de Ca^{2+} , não há alteração na PSIVE nas diastólicas menores que 10 mmHg dos grupos Controle e TBT (figura 9). Para as pressões diastólicas maiores o grupo TBT passa a responder menos ao estiramento da câmara cardíaca esquerda. Para avaliar se essa resposta é mediada pelas EROs foram utilizados antioxidantes que como ilustrado foram capazes de reverter a resposta inotrópica frente ao aumento da PD.

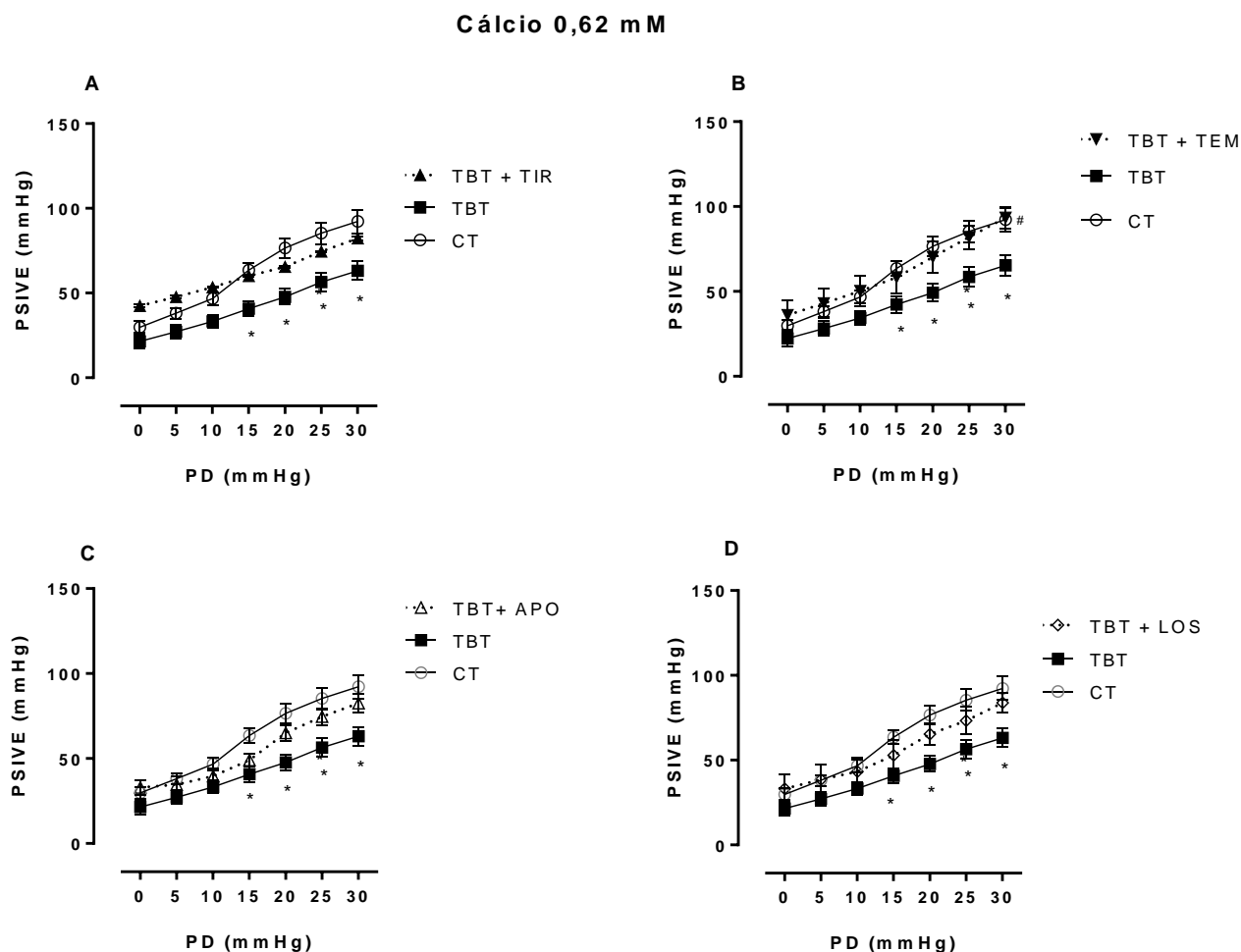


Figura 9 Curva de função ventricular: Pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE) e pressão diastólica (PD) em Ca^{2+} 0,62 mM; A: Grupos Controle (n=7), TBT (50 μM) (n=8) e TBT + Tiron (500 μM) (n=4) B: Grupos Controle, TBT e TBT + Tempol (100 μM) (n=5) C: Grupos Controle, TBT e TBT + Apocinina (30 μM) (n=4) e D: Grupo Controle, TBT e TBT + Losartan (10 μM) (n=4). Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias. * $p < 0,05$ vs Controle ; # $p < 0,05$ vs TBT.

A curva de função ventricular é um parâmetro que reflete a funcionalidade da maquinaria contrátil e embora a figura 8 e 9 demonstrem uma menor resposta absoluta da PSIVE frente ao aumento da PD, o incremento relativo da PSIVE nas concentrações de Ca^{2+} de 1,25 e 0,62 mM foram preservadas na maioria dos valores de PD. Esse resultado demonstra que a capacidade da maquinaria contrátil responder ao estiramento muscular manteve-se preservada após a exposição ao TBT, o que sugere que o mecanismo de Frank Starling também esteja preservado (figura 10).

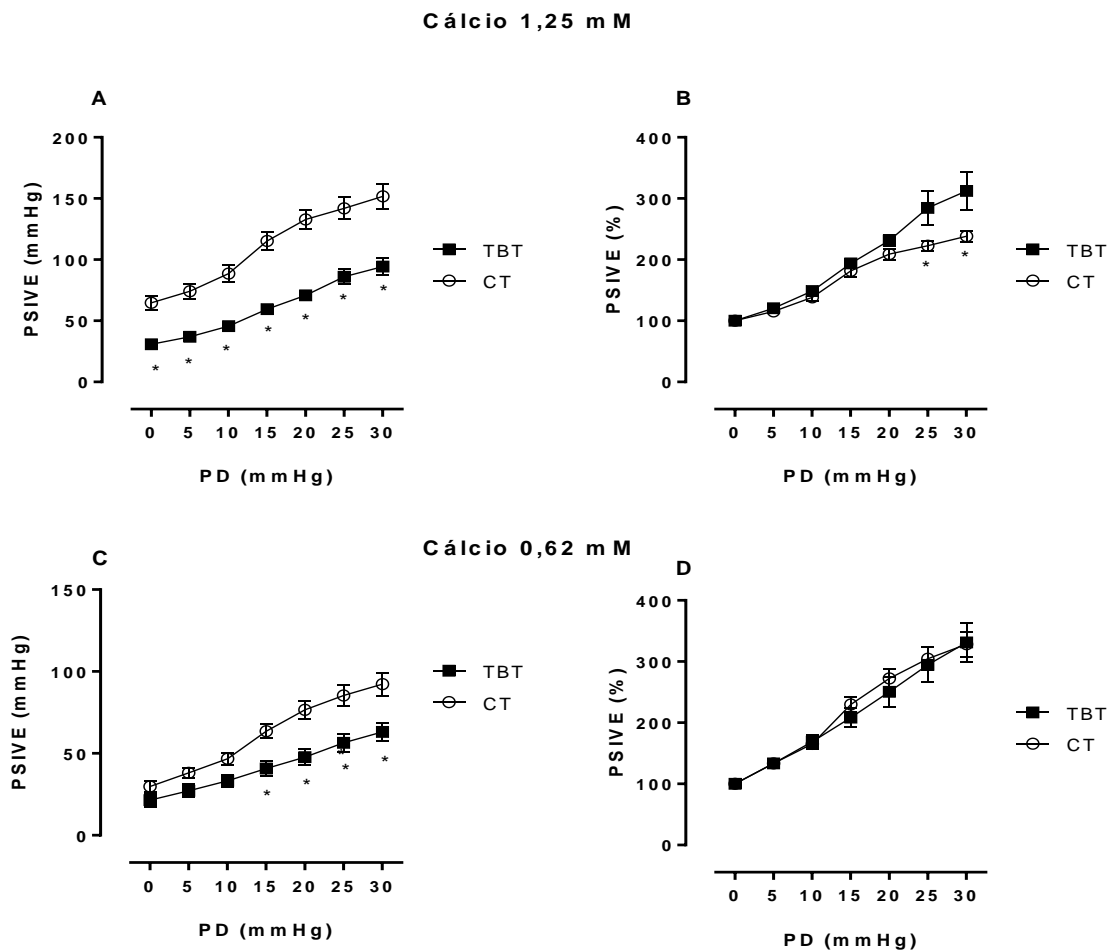


Figura 10 Curva de função ventricular e valores percentuais: Pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE) e pressão diastólica (PD). A: em Ca^{2+} 1,25 mM; B: valores percentuais em Ca^{2+} 1,25; C: em Ca^{2+} 0,62 mM e D: valores percentuais em Ca^{2+} 0,62 mM dos Grupos Controle e TBT (50 μM). Valores percentuais foram corrigidos em relação à PD=0 mmHg. Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias.* $p < 0,05$ vs Controle.

O agonista β -adrenérgico isoproterenol foi utilizado para avaliar se o TBT agudo poderia alterar a resposta miocárdica às intervenções inotrópicas. O efeito inotrópico positivo ao isoproterenol (100 μ L, 10^{-4} M, em bolus) foi menor no grupo tratado com TBT (figura 11A). O TBT também determinou redução da cinética de ativação e relaxamento frente a dose de isoproterenol (figura 11 B e C). A presença dos antioxidantes atenuou as alterações na resposta β -adrenérgica porém não foi capaz de revertê-las.

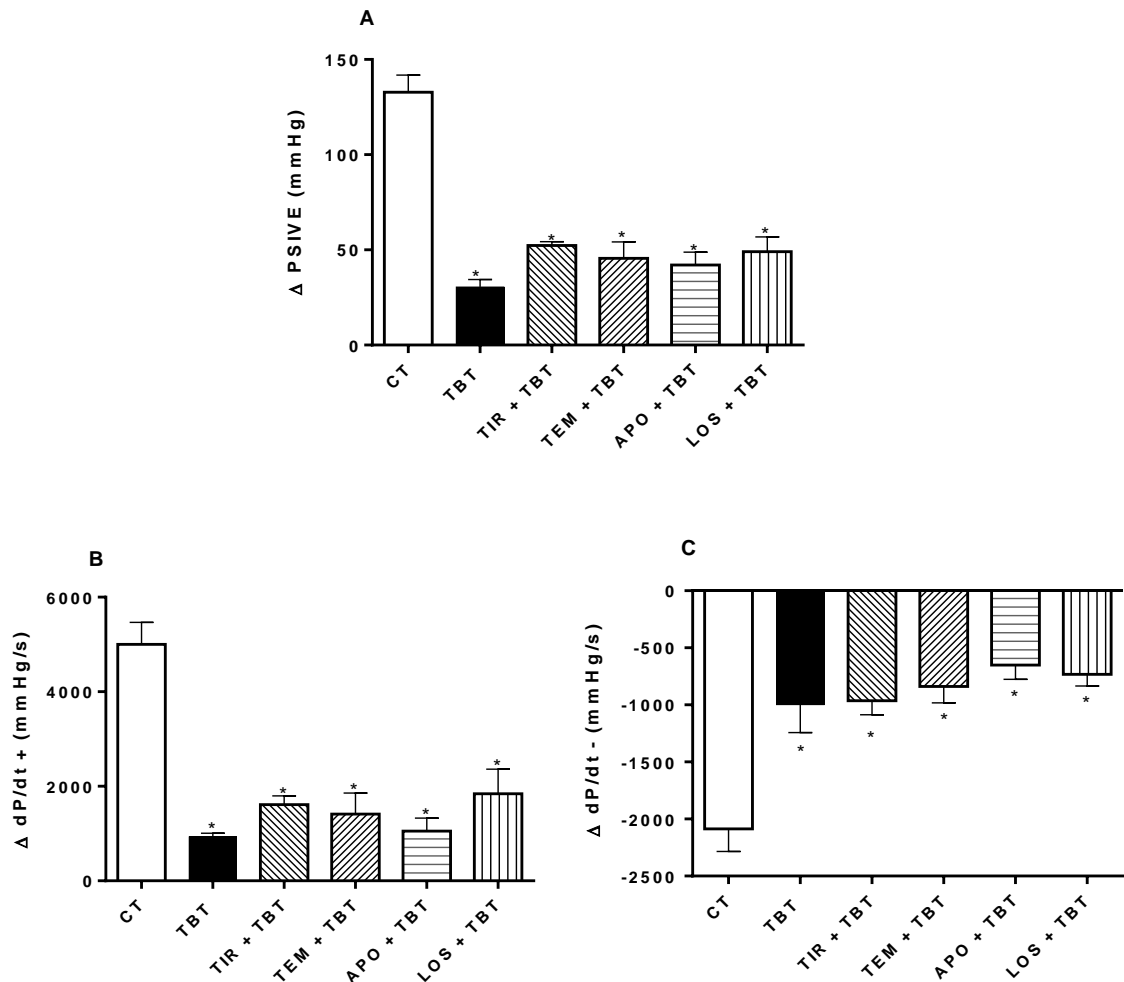


Figura 11 Efeitos da ativação β -adrenérgica por isoproterenol [Iso (100 μ L, 10^{-4} M, in bolus)] no sistema Lagendorff. A: Pressão sistólica isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PSIVE); B: Primeira derivada positiva (dP/dt +) e C primeira derivada negativa (dP/dt -) dos grupos Controle (n=7), TBT (50 μ M, n=8), TBT + Tiron (500 μ M) (n=5), TBT + Tempol (100 μ M) (n=5), TBT + Apocinina (30 μ M) (n=4) and TBT + Losartan (10 μ M) (n=5). Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias.* $p < 0,05$ vs Controle

Os tempos de ativação e relaxamento são os tempos despendidos, respectivamente, do início da contração até o pico máximo da pressão e do pico máximo até o período de relaxamento. Em relação a esses parâmetros temporais da contração do músculo cardíaco, pode-se observar na figura 12 que tanto o tempo de ativação como o tempo de relaxamento são maiores para os corações que foram expostos ao TBT assim como também é necessário um maior tempo para a ativação β adrenérgica promovida pelo Isoproterenol.

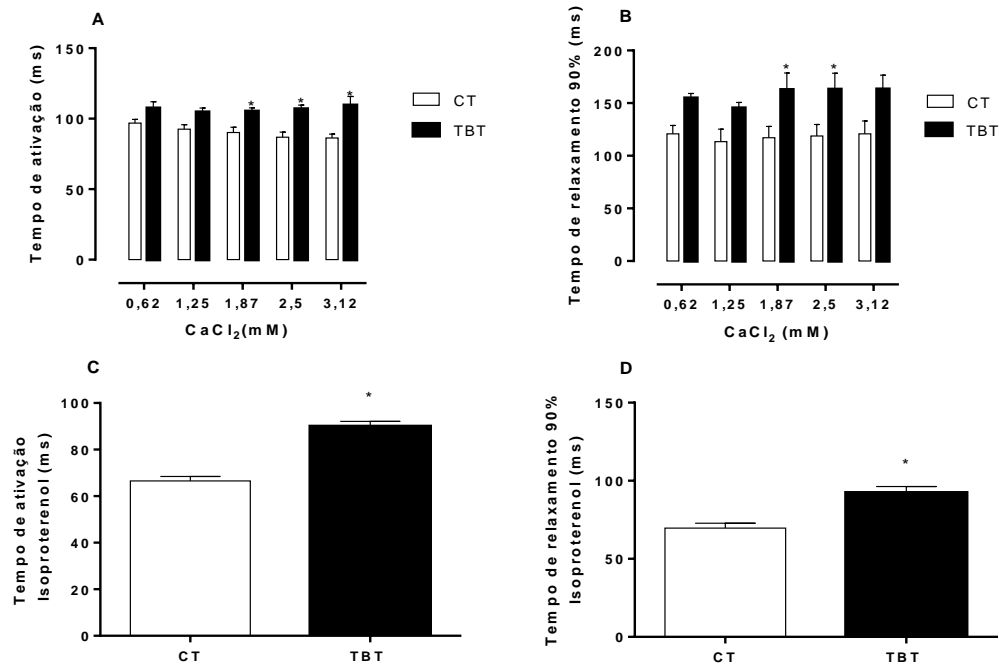


Figura 12 Avaliação dos parâmetros temporais da contração do músculo cardíaco. A: tempo de ativação durante a curva de Ca^{2+} ; B: tempo de relaxamento 90 % durante a curva de Ca^{2+} ; C: Tempo de ativação na dose de Isoproterenol ($100 \mu\text{L}$, 10^{-4} M , in bolus) e D: tempo de relaxamento 90% na dose de isoproterenol dos grupos Controle ($n=7$) e TBT ($50 \mu\text{M}$, $n=8$). Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias e Teste t (Isoproterenol)* $p<0,05$ vs Controle.

Os resultados obtidos até agora mostram que o TBT altera significativamente a resposta ao Ca^{2+} , a curva de Frank Starling bem como a resposta β adrenérgica. Outro parâmetro que pode ser avaliado é a pressão de perfusão coronariana. Como mostrado na figura 13 a PPC basal está significativamente aumentada no grupo TBT. A presença dos antioxidantes não reverteu aumento da PPC.

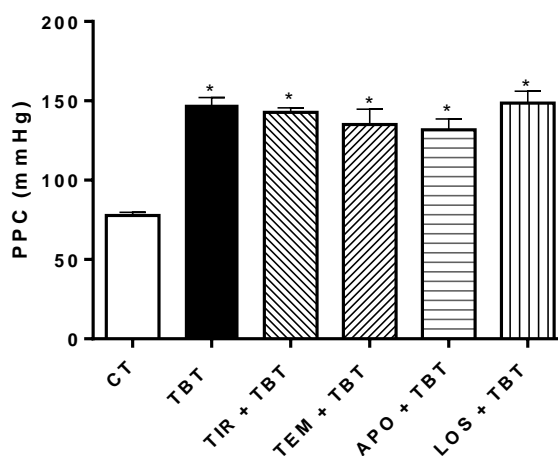


Figura 13 Valores basais de parâmetros coronarianos. Pressão de perfusão coronariana (PPC) dos grupos Controle (n=7), TBT (50 μM , n=8), TBT + Tiron (500 μM) (n=5), TBT + Tempol (100 μM) (n=5), TBT + Apocinina (30 μM) (n=4) and TBT + Losartan (10 μM) (n=5). Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias. * $p < 0,05$ vs Controle

4.3 Avaliação do estresse oxidativo miocárdico

A produção *in situ* de $O_2^{\bullet-}$ após os protocolos com o coração isolado está representada na figura 14. Como esperado, houve um aumento significativo do stress oxidativo nos corações que foram expostos ao TBT. A apocinina e o tiron não foram capazes de reverter esse aumento ao passo que o tempol e o losartan diminuíram a produção *in situ* de $O_2^{\bullet-}$ mostrando assim a um possível papel da angiotensina II e da SOD desmutase na mediação das respostas promovidas pelo TBT.

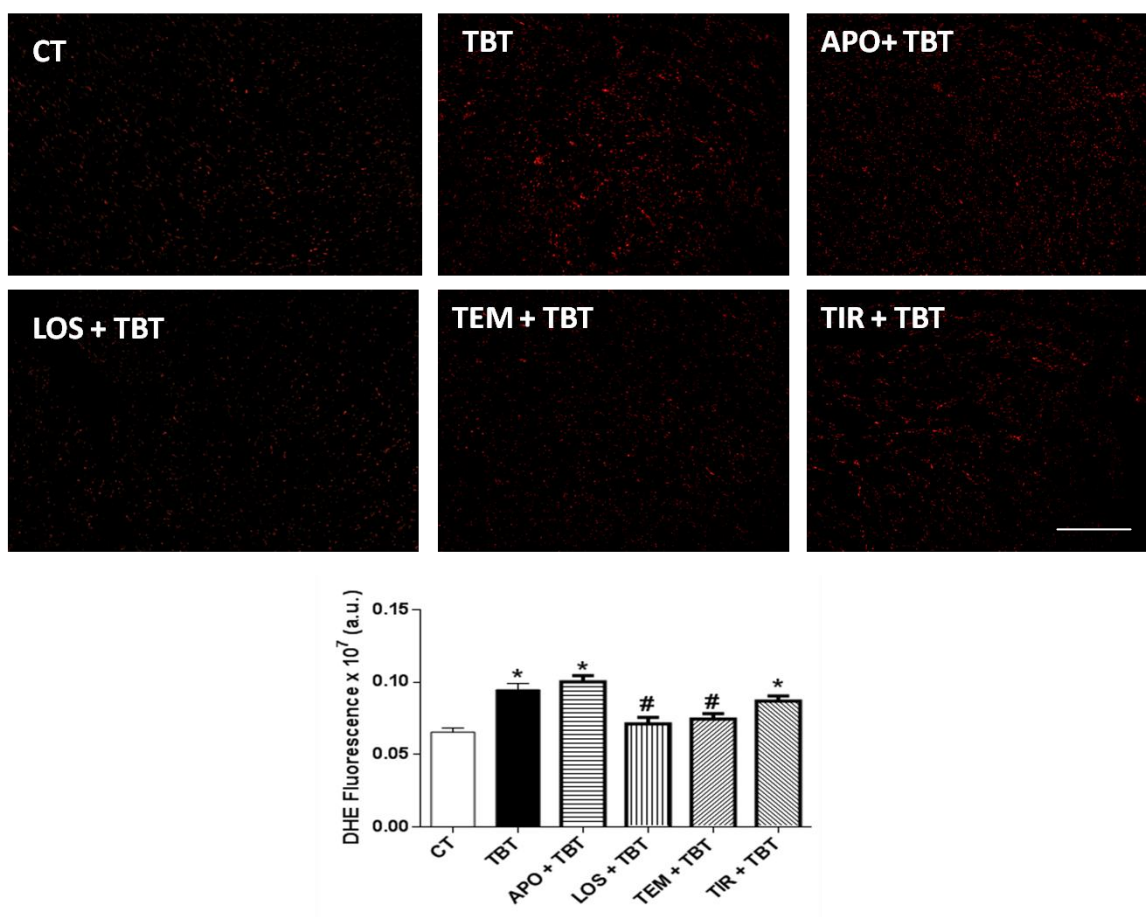


Figura 14 Detecção *in situ* de ânion superóxido. Micrografias de fluorescência do coração coradas com o corante sensível ao $O_2^{\bullet-}$ DHE (fluorescência vermelha) foram obtidas dos grupos Controle (n=4), TBT (n=4), TBT + Tiron (500 μ M) (n=4), TBT + Tempol(100 μ M) (n=4), TBT + Apocinina (30 μ M)(n=4) e TBT + Losartan (10 μ M) (n=4). Imagens foram adquiridas em idênticas configurações. Dados expressos como Média \pm EPM.* p < 0.05 vs Controle, # p < 0.05 vs TBT .

Para confirmar a detecção *in situ* de $O_2^{\bullet-}$ após os protocolos com o coração isolado, foi feita uma nova medição de produção de EROs em tiras de VE incubadas *in vitro* com TBT (50 μ M) e com os antioxidantes por 15 minutos. Na figura 15 é possível visualizar que o TBT novamente aumentou a produção *in situ* de $O_2^{\bullet-}$ quando comparado com o grupo controle e todos antioxidantes foram capazes de proteger esse aumento.

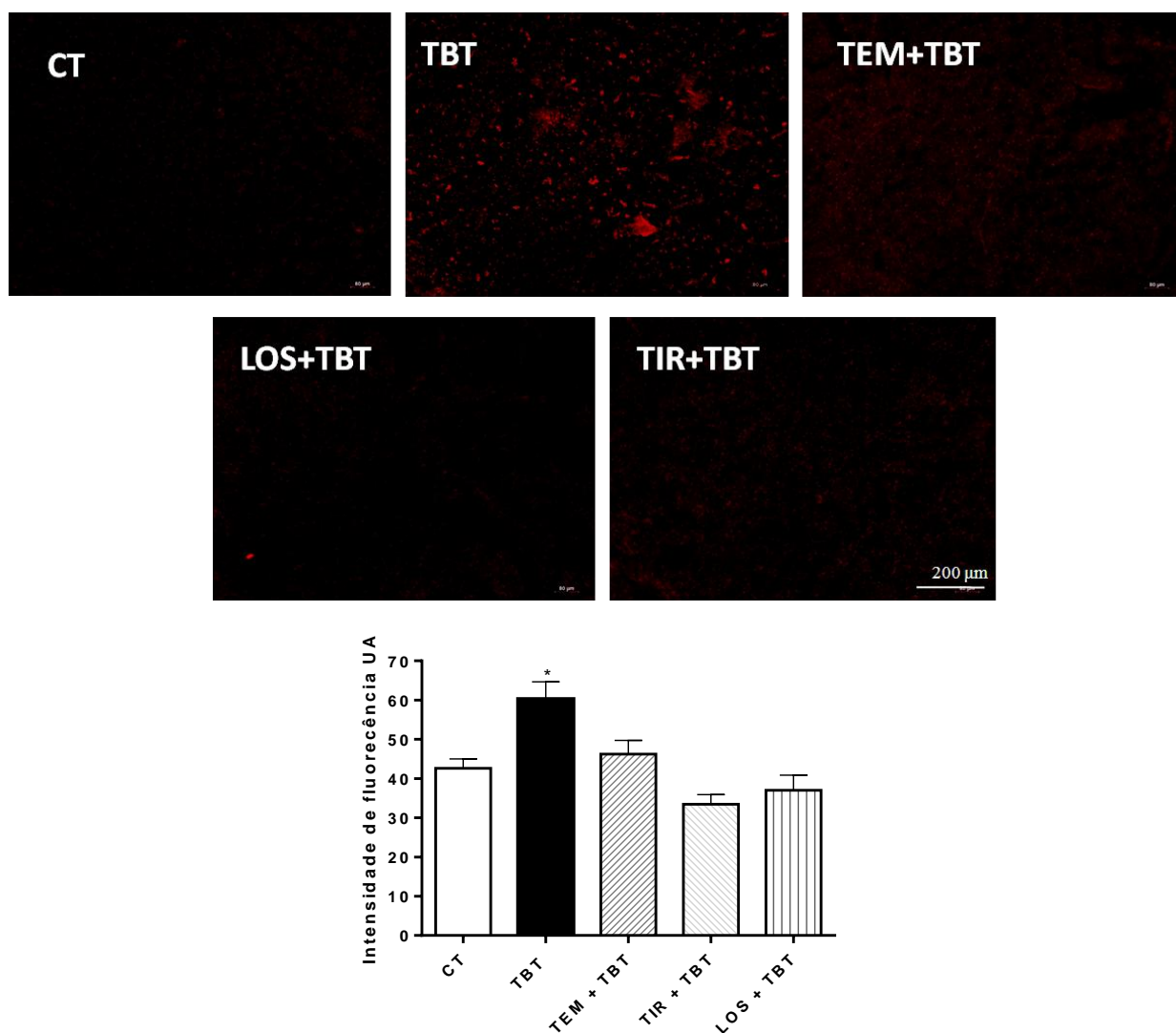


Figura 15 Detecção *in situ* de ânion superóxido *in vitro* após 15 min de incubação com TBT(50 μ M) e antioxidantes. Micrografias de fluorescência do coração coradas com o corante sensível ao $O_2^{\bullet-}$ DHE (fluorescência vermelha) foram obtidas dos grupos Controle (n=3), TBT (n=3), TBT + Tiron (500 μ M) (n=3), TBT + Tempol(100 μ M) (n=3) e TBT + Losartan (10 μ M) (n=3). Imagens foram adquiridas em idênticas configurações. Dados expressos como Média \pm EPM.* $p < 0.05$ vs Controle, # $p < 0.05$ vs TBT

4.4 Spark de Ca^{2+}

Os resultados referentes aos *sparks* de Ca^{2+} estão representados na figura 16. Observa-se que a frequência dos *sparks* foi significativamente maior no grupo TBT 10^{-7}M após 5 e 10 minutos de exposição a este composto. Concomitante, ocorreu uma diminuição da amplitude após 10 minutos de exposição ao TBT 10^{-7}M sugerindo uma diminuição do estoque de Ca^{2+} do RS. A figura 16 C mostra a representação dos *sparks* nos grupos Controle, TBT 10^{-8} e 10^{-7}M após 5 minutos de exposição ao TBT.

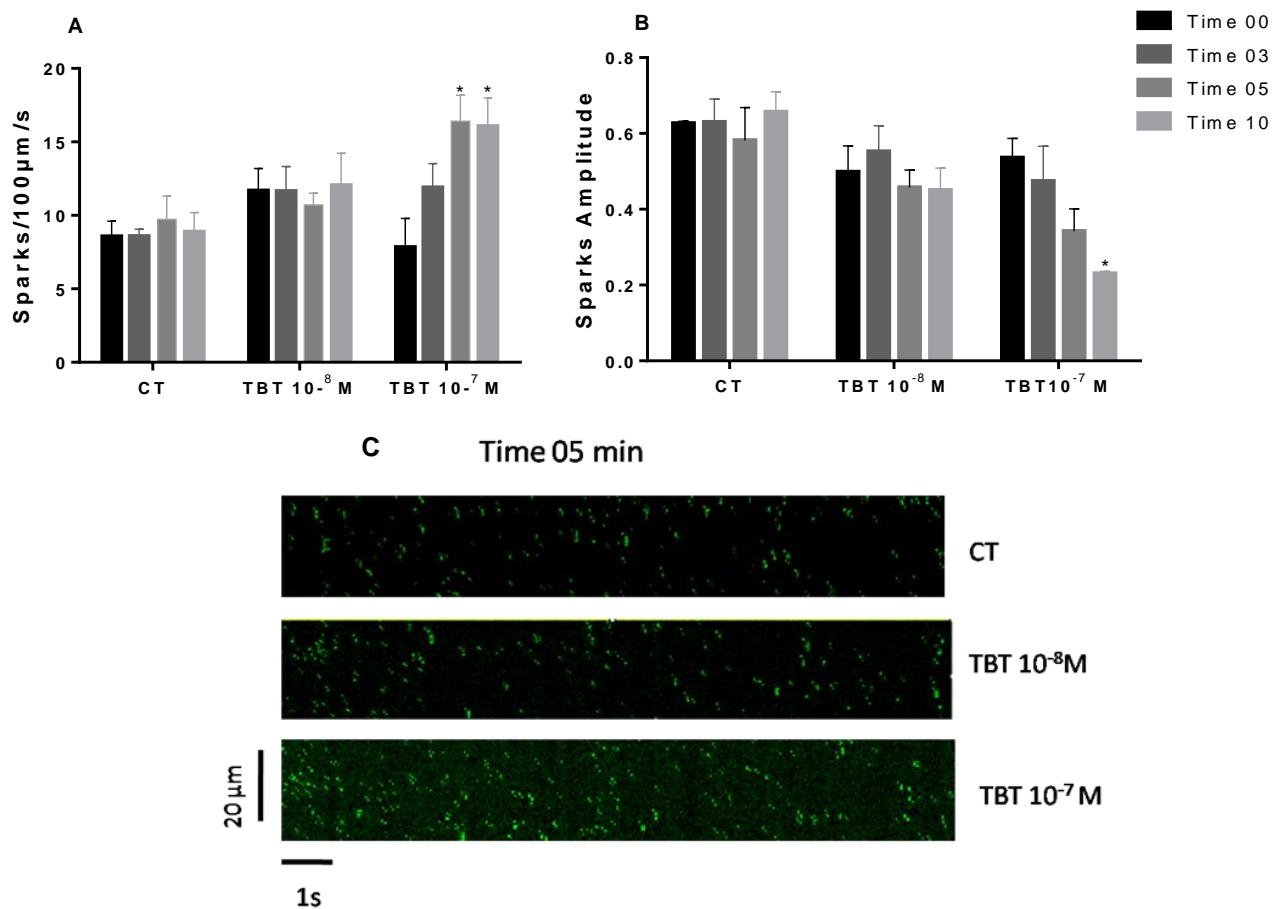


Figura 16 Análise dos *sparks* de Ca^{2+} no cardiomiócito. A: frequência; B: amplitude e C: representação dos *sparks* de Ca^{2+} após 5 minutos dos grupos Controle (n=4), TBT 10^{-7}M (n=4) e TBT 10^{-8}M (n=4). Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias.* $p < 0,05$ vs Controle

A largura total dos sparks na metade da amplitude máxima (FWHM) foi significativamente menor após 10 minutos de exposição ao TBT 10^{-7} M (figura 17 A).

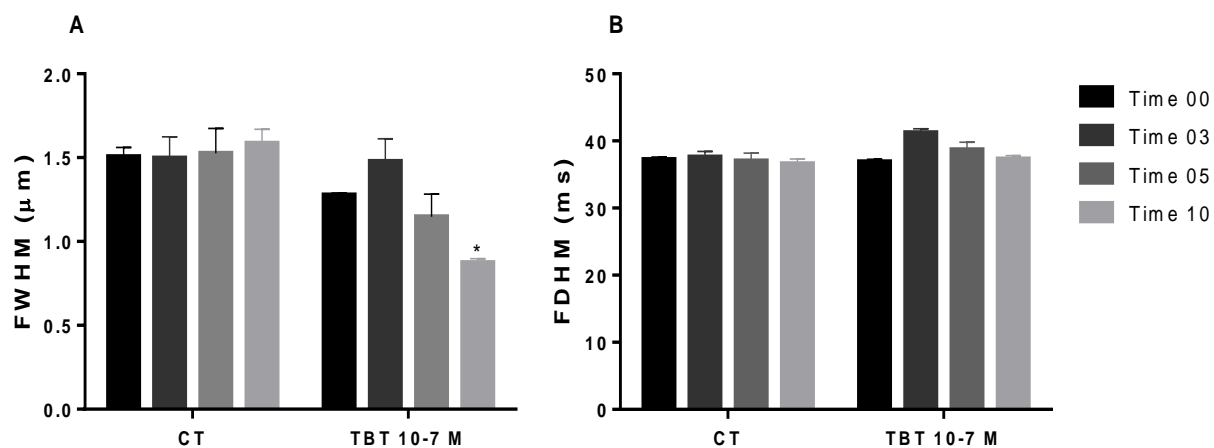


Figura 17 A: FWHM e B: FDHM dos grupos Controle (n=4) e TBT 10^{-7} M (n=4). Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias.* $p < 0,05$

Para avaliar o efeito do TBT sobre o transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos isolados e intactos, as células foram eletricamente estimuladas a 0,5 Hz via eletrodos extracelulares. O pico no transiente de Ca^{2+} foi significativamente reduzido após a exposição ao TBT 10^{-7}M indicando prejuízo na cinética de Ca^{2+} no RS. Na figura 18 A é possível visualizar que o Ca^{2+} não é completamente recaptado quando o estímulo é cessado.

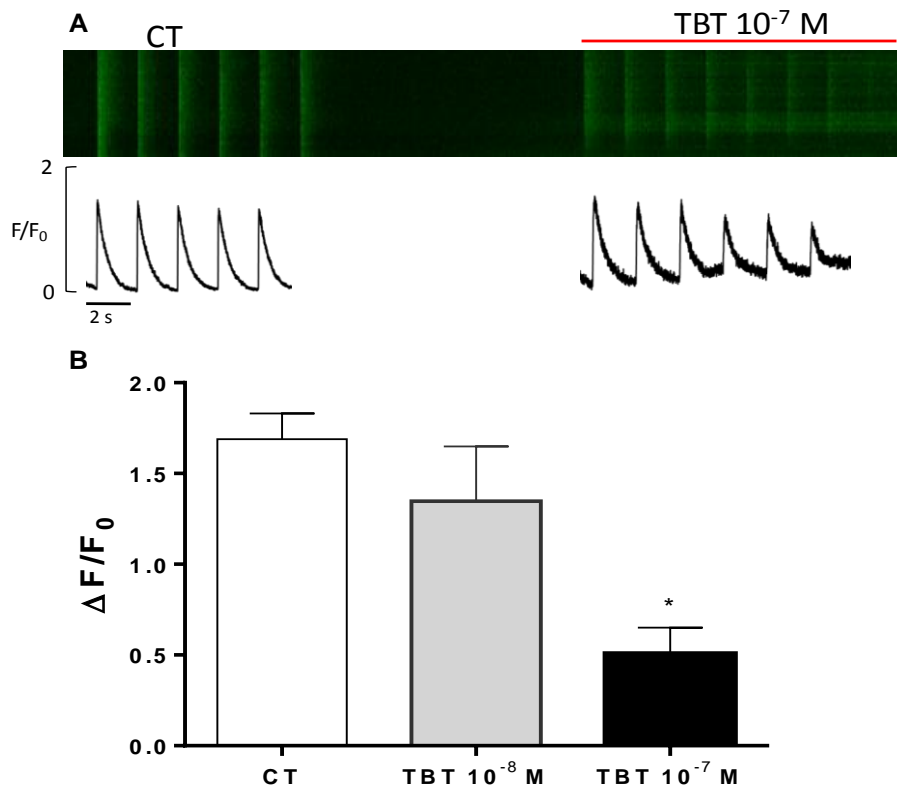


Figura 18 Transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos intactos dos grupos Controle (n=15) e TBT 10^{-7}M (n=3). A: Imagens confocais representativas do transiente de Ca^{2+} antes e depois da adição de TBT e B: Transiente de Ca^{2+} . Os dados de fluorescência foram normalizados como $\Delta F / F_0$, onde ΔF é a intensidade de fluorescência e F_0 é a fluorescência média em repouso. Dados expressos como Média \pm EPM. Teste t, *p<0,05 vs Controle.

O conteúdo de Ca^{2+} foi avaliado pela adição de cafeína em cardiomiócitos intactos. O TBT 10^{-7}M reduziu significativamente o conteúdo de Ca^{2+} quando comparado ao grupo Controle (figura 19 A). Para avaliar se o dantrolene, antagonista de RyR2, pode prevenir essa resposta, foi adicionado dantrolene previamente a adição de TBT. A inibição de RyR2 preveniu a diminuição do conteúdo de Ca^{2+} na presença do TBT (figura 19 C). As figuras 19 B e D, ilustram o registro das análises dos conteúdos de Ca^{2+} .

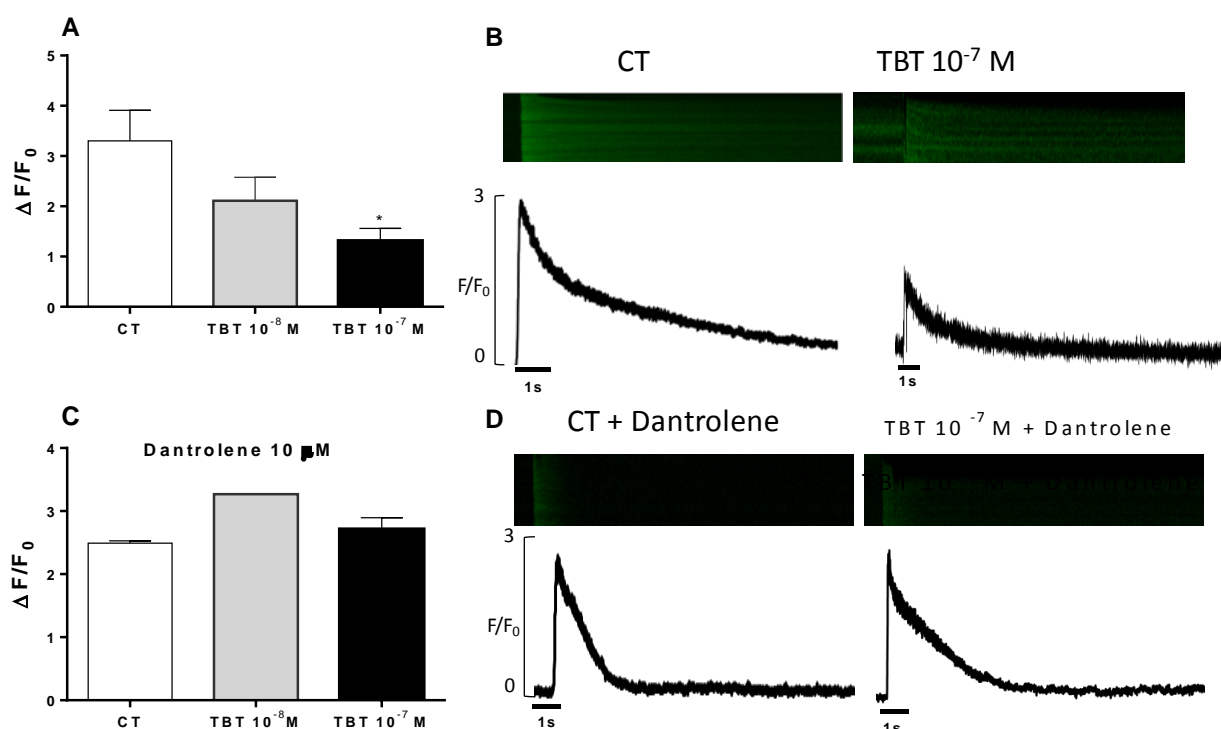


Figura 19 Conteúdo de Ca^{2+} em cardiomiócitos intactos de ratos. A: Pico de liberação de Ca^{2+} do RS induzido por cafeína (10 mM) B: Representação da liberação de Ca^{2+} do RS induzida por cafeína dos grupos Controle (n=4) e TBT 10^{-7} (n=3) C: Efeitos do dantrolene (10 μM) na liberação de Ca^{2+} induzida por cafeína dos grupos Controle (n=2) e TBT 10^{-7} (n=2) e D: Representação dos efeitos do dantrolene dos grupos Controle + Dantrolene e TBT 10^{-7} + Dantrolene. Os dados de fluorescência foram normalizados como $\Delta F / F_0$, onde ΔF é a intensidade de fluorescência e F_0 é a fluorescência média em repouso. Dados expressos como Média \pm EPM. Teste t, * $p < 0,05$ TBT vs Controle.

Para avaliar o papel do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ no transiente de Ca^{2+} de cardiomiócitos intacto, foi feito o bloqueio do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que indicou que houve redução do transiente nos cardiomiócitos expostos ao TBT quando comparado ao grupo Controle (figura 20). Porém, essa diminuição do transiente é semelhante a que foi observada na ausência do bloqueador do trocador.

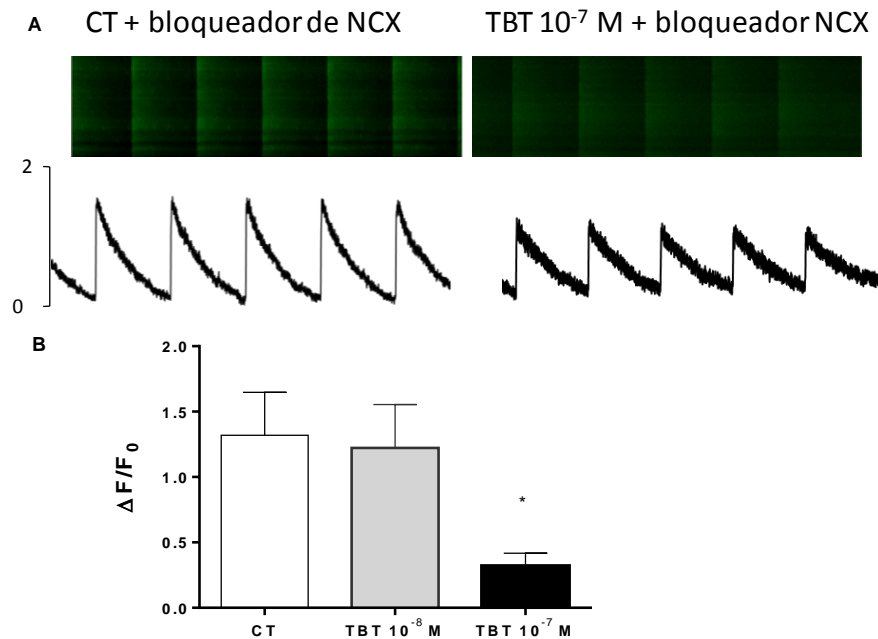


Figura 20 Efeitos do bloqueio do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ no transiente de Ca^{2+} de cardiomiócitos intactos. A: Imagem representativa do transiente de Ca^{2+} e B: Transiente de Ca^{2+} dos grupos Controle + NCX blocker (n=3) e TBT 10^{-7} + NCX blocker (n=3). Os dados de fluorescência foram normalizados como $\Delta F / F_0$, onde ΔF é a intensidade de fluorescência e F_0 é a fluorescência média em repouso. . Dados expressos como Média \pm EPM. Teste t, * $p < 0,05$ vs Controle.

Um dos indícios de sobrecarga de Ca^{2+} intracelular é o aumento da pressão diastólica. A figura 21 mostra que durante a curva de Ca^{2+} nos corações isolados, a PD dos corações expostos ao TBT tende a aumentar conforme se aumenta a concentração de Ca^{2+} na solução nutritora e é significativamente maior na última concentração da curva de cálcio. É possível notar a instabilidade da PD no grupo TBT.

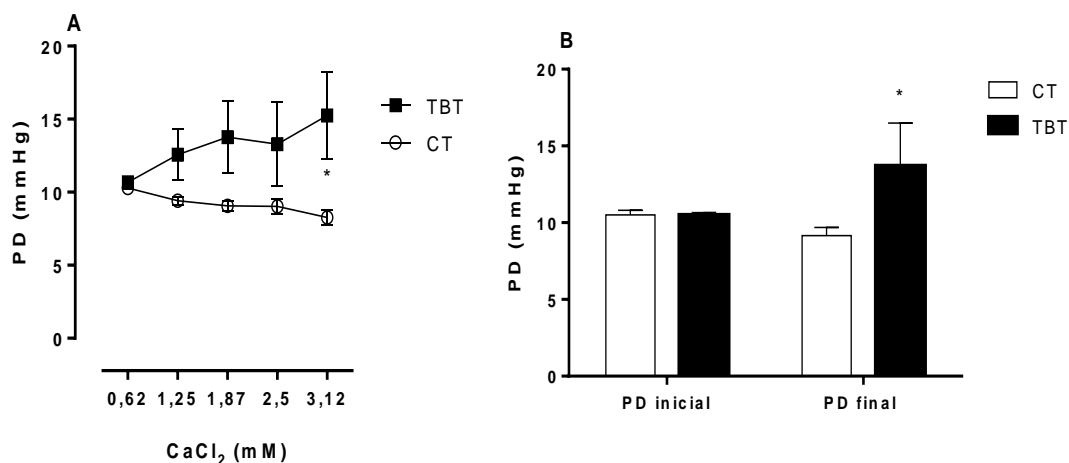


Figura 21 Pressão diastólica em corações isolados. A: durante a curva de Ca^{2+} e B: antes e após a realização de todos os protocolos dos grupos Controle (n=7) e TBT (50 μM , n=8) em corações isolados pela técnica de Langendorff. Dados expressos como Média \pm EPM. ANOVA 2 vias.* $p < 0,05$ vs Controle.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo investigamos os efeitos agudos do TBT sobre a contratilidade miocárdica em corações isolados e em cardiomiócitos. Os principais resultados obtidos neste estudo apontam que a exposição aguda ao TBT 50 μ M é responsável por prejudicar a contratilidade do ventrículo esquerdo e parece depender de um prejuízo na função do RS. A perfusão com TBT 50 μ M durante 5 min foi capaz de aumentar a produção de EROS que poderiam estar envolvida na resposta inotrópica negativa deste organoestanho.

A função cardíaca foi estudada em corações isolados expostos ao TBT (50 μ M) durante 5 minutos e perfundidos de acordo com a técnica de Langendorff. Essa concentração foi escolhida baseada no cálculo do EC50 obtido da curva de concentrações resposta ao TBT (10^{-9} – 10^{-2} M) nos músculos papilares isolados contraindo isometricamente.

O efeito inotrópico negativo observado no grupo TBT poderia ser dependente de sua ação sobre as proteínas contráteis. Avaliamos o efeito do TBT sobre a maquinaria contrátil, de maneira indireta, por meio da análise da curva estiramento tensão, a qual é dependente das proteínas contráteis e também das proteínas regulatórias da contratilidade como a TnC e a titina. A base do mecanismo de Frank Starling é o aumento da força quando o músculo é estirado. Os mecanismos celulares subjacentes à resposta de Frank Starling incluem um aumento na sensibilidade ao miofilamento para Ca^{2+} , diminuição do espaçamento da rede de miofilamentos conhecido como efeito Laticce, e aumento da cooperatividade do filamento fino (Starling e Visscher, 1927). O incremento relativo da PSIVE nas concentrações de Ca^{2+} de 1,25 e 0.62 mM foi preservado na maioria dos valores de PD. Esse resultado demonstra que a capacidade da maquinaria contrátil responder ao estiramento muscular manteve-se preservada após a exposição ao TBT, o que sugere que o mecanismo de Frank Starling também esteja preservado. Como o mecanismo de Frank Starling depende grandemente da maquinaria contrátil, especialmente dos filamentos de titina, é possível que o TBT esteja produzindo um efeito inotrópico negativo mais dependente de mecanismos homeométricos que envolvam o movimento de Ca^{2+} intracelular.

A regulação homeométrica foi analisada por meio da curva de concentrações crescentes de Ca^{2+} e também pela resposta β -adrenérgica. A resposta inotrópica a este íon e também ao isoproterenol foi significativamente reduzida quando comparada ao grupo controle em corações isolados, sustentando assim a hipótese de que a redução da contratilidade promovida pelo TBT envolve principalmente o movimento de Ca^{2+} intracelular. Conhecidamente, os compostos organoestânicos afetam o transporte de Ca^{2+} em diferentes tipos celulares (Isomura

et al., 2013, Gennari et al, 2000). Os resultados obtidos por Isomura et al. 2013, sugeriram que o TBT 700 nM em células de neuroblastoma humano aumentam a concentração de Ca^{2+} intracelular por liberar Ca^{2+} do RS causando o chamado estresse do RS o qual é caracterizado pela perturbação na homeostase do Ca^{2+} intracelular. De modo semelhante, os nossos dados em conjunto indicam que a alteração no movimento de Ca^{2+} está associada com prejuízo na função do RS provocado pela exposição ao TBT. Também é importante ressaltar que as EROs parecem influenciar na menor reposta ao Ca^{2+} visto que a presença do antioxidante tiron reverteu parcialmente esta resposta.

A ativação dos receptores β -adrenérgicos também é uma forma de avaliar a regulação homeométrica cardíaca. Os resultados obtidos mostraram que o TBT reduziu significativamente as respostas inotrópicas e lusitrópicas β -adrenérgicas. A ligação de agonistas, tal como o isoproterenol, induz a formação de produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) a partir de ATP através da ação da enzima adenilato ciclase (Xiang, 2011). Evidências indicam que compostos organoestânicos, como o trietilestanho e o trifenilestanho inibem a adenilato ciclase em cérebro de ratos, reduzindo assim os níveis de AMPc (Leow et al, 1979). Portanto, as alterações nas resposta β adrenérgicas encontradas no presente estudo podem estar associadas com uma diminuição dos níveis de AMPc. Adicionalmente, Cameron et al 1991, sugeriu que os triorganoestânicos inibem a atividade da Na^+K^+ -ATPase. Uma vez que a Na^+K^+ -ATPase está envolvida no transporte ativo de catecolaminas, os triorganoestânicos não só inibem o transporte de catecolaminas mas também, em certa medida, afetam a ligação das catecolaminas aos seus receptores contribuindo assim para uma menor resposta adrenérgica.

Além das alterações na resposta inotrópica, o TBT também interferiu nos parâmetros temporais da contração do músculo cardíaco, aumentando tanto o tempo de ativação quanto o tempo de relaxamento. O transporte de Ca^{2+} pelo RS cardíaco tem um papel chave no AECC, onde a liberação de Ca^{2+} do RS induz a contração e o re-acúmulo de Ca^{2+} pelo RS por meio da atividade da SERCA2a leva ao relaxamento (Bers, 2002). Kodavanti et al. 1991 realizaram experimentos para avaliar o efeito do TBT ($\text{IC}_{50}=2\mu\text{M}$), e outros organoestânicos (trietilestanho e trimetilestanho) na SERCA de ratos, bem como em proteínas do RS. Os autores relataram que todos os composto testados inibiram a atividade da SERCA de uma maneira concentração dependente, fato este que pode afetar o mecanismo de bombeamento de Ca^{2+} para o RS. Se a recaptção de Ca^{2+} no RS for prejudicada, então pode ocorrer uma

sobrecarga de Ca^{2+} no citosol e consequentemente os parâmetros temporais da contração serão afetados. No nosso estudo, a liberação e a recaptação de Ca^{2+} pelo RS foi medida através da análise do transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos intactos que evidenciou uma queda no pico do transiente de cardiomiócitos expostos ao TBT. Esses dados sugerem fortemente que o TBT prejudica a liberação e a recaptação de Ca^{2+} pelo RS podendo então alterar todo funcionamento normal da célula cardíaca.

Nós acreditamos que a redução do transiente de Ca^{2+} também pode estar relacionada a alterações do potencial de membrana promovido pelo TBT. Chikahisa e Oyama, 1992, mostraram que o TBT na concentração de 10^{-7}M pode promover o influxo de Ca^{2+} em timócitos e resultar em hiperpolarização da membrana por ativar correntes de K dependentes de Ca^{2+} (I_{KCa}). O bloqueio dos canais para K dependentes de Ca^{2+} com quinina impediu a hiperpolarização. Adicionalmente, como citado anteriormente o TBT pode inibir a atividade da Na^+K^+ -ATPase. Esses fatores em conjunto podem afetar o potencial de membrana dos cardiomiócitos alterando assim a sua excitabilidade.

A exposição ao TBT aumentou a frequência e diminuiu a amplitude dos *sparks*. Esses dados são consistentes com o fato de que o aumento da frequência dos sparks aumenta o efluxo de Ca^{2+} do RS ocasionando uma depleção dos estoques de Ca^{2+} do RS. Considerando que o TBT também pode estar inibindo a SERCA2a, prejudicando a recaptação de Ca^{2+} , depletando ainda mais os estoques do RS e levando então a uma sobrecarga de Ca^{2+} diastólico no citosol. O conteúdo de Ca^{2+} do RS foi avaliado pela adição de cafeína 10 mM nos cardiomiócitos intactos expostos ao TBT que confirma esta hipótese. A redução do conteúdo de Ca^{2+} foi revertida na presença de dantrolene, inibidor de RyR2. Esse resultado sugere que o efeito inotrópico negativo induzido pelo TBT deve depender, pelo menos em parte, de sua ação sobre RyR2 nos cardiomiócitos de ratos. O mecanismo pelo qual o TBT age no RyR2 precisa ser melhor investigado, no entanto é possível que os RyR2 possam ter sido oxidados pelos radicais livres, o que os torna mais instáveis, levando ao aumento da frequência dos sparks e consequentemente ao esvaziamento do RS. As EROs desempenham um papel importante como segundos mensageiros na homeostase cardíaca e são capazes de oxidar RyR2. A ativação oxidativa do RyR2 pode ser importante em termos de regulação da contração cardíaca bem como do relaxamento, uma vez que a ativação de RyR2 influencia sensivelmente a concentração local de Ca^{2+} citosólica (Kohler, 2013). Oda et al, 2015 mostraram que a oxidação de RyR2 promovida por H_2O_2 reduz a afinidade da calmodulina e

leva a mudanças conformacionais de RyR2. Sabendo-se que os eventos de liberação espontâneas de Ca^{2+} durante a diástole, os *sparks* de Ca^{2+} , são provenientes da abertura dos RyR2 quando a célula está em repouso, a oxidação de RyR2 pelas EROs pode ser uma possível causa do aumento da frequência de sparks neste estudo, visto que demonstramos que o TBT aumentou a produção de EROs no músculo cardíaco.

Embora não tenhamos analisado por qual mecanismo o TBT atuaria inibindo a SERCA evidências mostram que os organoestênicos podem interagir com os grupos tiol da SERCA resultando na sua inibição (Sahib e Desai, 1987). Não podemos descartar também a possibilidade de a inibição ser devido a inibição da síntese de ATP. O TBT vem sendo identificado como um potente inibidor da ATP sintase na mitocôndria. (Aldridge, 1976; Matsuno-Yagi e Hatefi, 1993; Von et al., 2004), uma vez que o transporte ativo de Ca^{2+} através do RS é um processo que requer energia, o potente efeito inibitório do TBT na produção de ATP pode levar a diminuição/falta de disponibilidade de substrato para translocação de Ca^{2+} e dessa forma assim inibir a SERCA.

Em ratos, a atividade da SERCA é responsável por cerca de 90% da recaptção do Ca^{2+} após a contração enquanto que o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (7%) e a bomba de Ca^{2+} da membrana (1%) possuem uma menor participação na extrusão de Ca^{2+} (Bers, 2002). Como a recaptção de Ca^{2+} pela SERCA pode estar inibida, então supomos que a recaptção seria basicamente pela atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Para explorar esta possibilidade foi feito o bloqueio do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que reduziu o transiente de Ca^{2+} nos cardiomiócitos de ambos os grupos. Assim, parece que a função do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ não foi afetada pelo TBT.

Como já exposto, o TBT parece estar promovendo aumento do Ca^{2+} diastólico possivelmente devido ao aumento da frequência dos *sparks* e prejuízo na recaptção de Ca^{2+} pelo RS. A sobrecarga de Ca^{2+} no citosol pode resultar em aumento da pressão diastólica e, conseqüentemente menos Ca^{2+} estará disponível para a sístole gerando, portanto, diminuição da força de contração (Vassalle e Lin, 2004). Nossos achados mostraram elevação da pressão diastólica em corações isolados, principalmente quando o coração foi perfundido com concentrações maiores de Ca^{2+} , sendo este, portanto, indício que a exposição ao TBT promove sobrecarga de Ca^{2+} diastólico no coração.

Em geral os cardiomiócitos apresentam diferentes vias para aumentar $[\text{Ca}^{2+}]_i$, incluindo os canais de Ca^{2+} na membrana celular e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) - e liberação de Ca^{2+}

sensível a RyR2. O estudo de Unno et al 2009, demonstrou que o TBT facilita a entrada de Ca^{2+} no citosol através de canais para Ca^{2+} voltagem dependente do tipo L em células neurais PC12. Alguns estudos, como o de Unno, mostram que a origem do aumento de Ca^{2+} é extracelular (Chikahisa e Oyama, 1992). Por outro lado, outros autores demonstraram que a retirada do Ca^{2+} extracelular não afetou o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Viviani et al. 1995, Isomura et al. 2013).

Muitos estudos vêm demonstrando que a exposição ao TBT induz ao aumento da geração de EROs com subsequentes danos oxidativos em diversos sistemas como o vascular, neural, reprodutivo, imunológico, células linfócitos-T e neuroblastoma em modelos *in vivo* e *in vitro* (Ishihara et al., 2012; Katika et al., 2011; Kato et al., 2013; Isomura et al., 2013; Mitra et al., 2014, Rodrigues et al., 2014, Nishimura et al., 2015, Ximenes, 2016). De modo semelhante, nossos dados demonstraram um aumento da produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ nos corações perfundidos com TBT 50 μM quando comparado com o grupo Controle. O aumento de EROs pode ser atribuído à interação direta de compostos organoestânicos com grupos -SH livres em proteínas e também devido à inibição da atividade de algumas enzimas, como a SOD (Milaeva et al., 2006). No nosso estudo, quando o coração foi perfundido por TBT e Tempol, o qual é um mimético da SOD, houve uma diminuição na detecção da produção *in situ* de $\text{O}_2^{\bullet-}$. O Losartan que é um bloqueador dos receptores AT1 também foi capaz de reduzir a produção de EROs mostrando uma possível ativação de receptores para angiotensina II no aumento da produção de EROs.

CONCLUSÃO

A exposição aguda ao TBT 50 μM promoveu efeito inotrópico negativo no coração, aumentou a produção cardíaca de EROs, diminuiu o conteúdo de Ca^{2+} do RS e aumentou a frequência espontânea dos *sparks* de Ca^{2+} . Os resultados sugerem que o TBT atue sobre as proteínas reguladoras do movimento de Ca^{2+} desestabilizando o receptor de RyR2 e reduzindo a atividade da bomba de Ca^{2+} do RS, SERCA2a, que parecem ser modulados, pelo menos em parte, pelas EROs (figura 22).

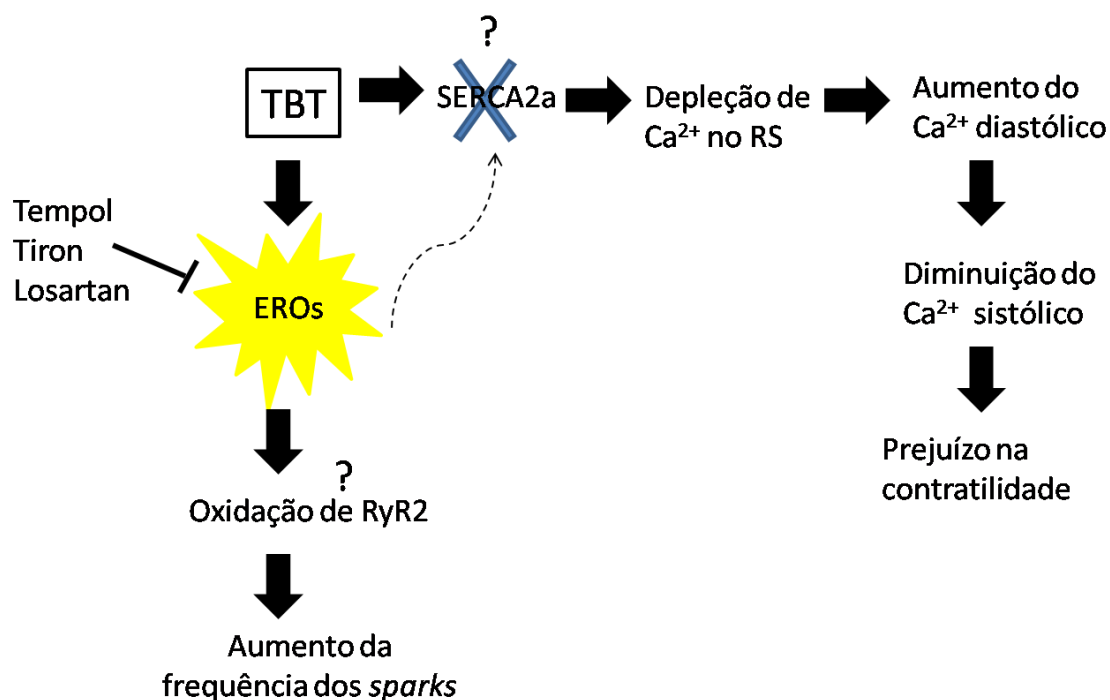


Figura 22 Hipótese dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na cardiotoxicidade do TBT

6 REFERÊNCIAS

- ALDRIDGE W. N.; STREET B. W. & SKILLETER D. N. Oxidative phosphorylation: Halide dependent and halide-independent effects of triorganotin and triorganolead compounds on mitochondrial functions. **Biochem. J.** v.168, p.353-364, 1977
- ALMEIDA E., DIAMANTINO T.C. & DE SOUSA O. Marine paints: The particular case of antifouling paints. **Prog. Org. Coat.** v.59, p.2-20, 2007
- ALZIEU C. Environmental impact of TBT: the French experience. **Sci. Total Environ.** v. 258, p. 99-102, 2000
- AZENHAM. A.; EVANGELISTA R.; MARTEL F & VASCONCELOS M. T. Estimate of the digestibility, assimilability and intestinal permeability of butyltins occurring in wine. **FoodChem. Toxicol.** v.48, p.767-773, 2008
- BERS, D. M. Excitation- contraction coupling. **Nature.** v. 415, p. 198-205, 2002
- BILA, D. M. & DEZOTTI M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Quím. Nova.** v.30, p. 651-666, 2007
- BLAJSZCZAK C & BONINI M.G. Mitochondria targeting by environmental stressors: implications for redox cellular signaling. **Toxicology.** v. p. 2017
- CAMERON, J. A.; KODAVANTI P.R.S. PENTYALA S.N. & DESAIAHT D. Triorganotin Inhibition of Rat Cardiac Adenosine Triphosphatases and Catecholamine Binding. **Journal of Applied Toxicology**, v. 11, p. 403-409, 1991
- CASALS-CASAS, C.; FEIGE, J. N. & DESVERGNE, B. Interference of pollutants with PPARs: endocrine disruption meets metabolism. **International Journal of Obesity** (Lond) Suppl. v. 6, p. 53-56, 2008
- CASTRO, I. B.; BEMVENUTI, C. E. & FILLMANN, G. Preliminary Appraisal of Imposex in Areas Under the Influence of Southern Brazilian Harbors. Campinas: **J. of the Brazilian Society of Ecotoxi.** v. 2, p.73-79, 2007
- CHAMP M.A. & LOWENSTEIN F.L. The Dilemma of High Technology Antifouling **Paints.** **Oceanus.** v. 30, p. 69-77, 1987

CHIKAHISA L & OYAMA Y. Tri-n-butyltin increases intracellular Ca^{2+} in mouse thymocytes: a flow-cytometric study using fluorescent dyes for membrane potential and intracellular Ca^{2+} . **Pharmacology & Toxicology**. v.71, p. 190-195, 1992

COOKE G. M.; TRYPHONAS H.; PULIDO O.; CALDWELL D.; BONDY G. S & FORSYTH D. S. Oral (gavage), in utero and postnatal exposure of Sprague-Dawley rats to low doses of tributyltin chloride. Part 1: Toxicology, histopathology and clinical chemistry. **Food Chem. Toxicol.** v.42, p. 211-220, 2004

COSTA, M. B.; OTEGUI, M. B. P.; BARBIERO, D. C & FERNANDEZ, M. A. S. *Cymatium parthenpeum parthenpeum* (von Salis, 1793) (Mesogastropoda:Ranellidae): A new bioindicator of organotin compounds contamination. **J. of the Brazilian Society of Ecotoxi.**, v. 3, p. 65-69, 2008

DE CARVALHO OLIVEIRA, R. & SANTELLI, R. E. Occurrence and chemical speciation analysis of organotin compounds in the environment: A review. **Talanta**, v.82, p.9–24, 2010

DELGADO FILHO, V. S.; LOPES, P. F.; PODRATZ, P. L.&GRACELI, J. B. Triorganotin as a compound with potential reproductive toxicity in mammals. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v. 44, p. 958–965, 2011.

DONARD, O.F.X. & WEBER, J.H. Behaviour of methyltin compounds under simulated conditions. **Environ. Sci. Technol.** v.19, p. 1104-1110, 1985

DOS SANTOS D.M., Compostos organoestânicos no material particulado em suspensão e sedimentos superficiais no eixo leste oeste do complexo estuarino de Paranaguá, PR. Dissertação, Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná, 2008

DOS SANTOS, R. L.; PODRATZ, P. L.; SENA, G. C.; FILHO, V. S.; LOPES, P. F.; GONÇALVES, W. L.; ALVES, L. M.; SAMOTO, V. Y.; TAKIYA, C. M.; DE CASTRO MIGUEL E.; MOYSÉS, M. R. & GRACELI, J. B. Tributyltin impairs the coronary vasodilation induced by 17β -estradiol in isolated rat heart. **J. Toxicol. Environ. Health A**, v. 75, p. 948–959, 2012

DONOSO, P.; PRIETO H & C. HIDALGO. Luminal calcium regulates calcium release in triads isolated from frog and rabbit skeletal muscle. **Biophys. J.** v. 68, 507–515, 1995

FAIT A.; FERIOLI A. & BARBIERI F. Organotin compounds. **Toxicology**. v.91, p. 77-82, 1994

FELIZZOLA J.F. Especificação de Compostos Butílicos de Estanho em Sedimentos Superficiais da Baía de Todos os Santos. Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005

FENT, K. Ecotoxicology of organotin compounds. Crit. Rev. **Toxicology**. v. 26, p. 1–117, 1996

GENNARI, A.; VIVIANI, B.; GALLI, C. L.; MARINOVICH, M.; PIETERS, R.& CORSINI, E. Organotins Induce apoptosis by disturbance of $[Ca^{2+}]_i$ and mitochondrial activity, causing oxidative stress and activation of caspases in rat thymocytes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 169, p.185–190, 2000

GILL J.S.; MCKENNA W.J. & CAMM A.J. Free radicals irreversibly decrease Ca^{2+} currents in isolated guinea-pig ventricular myocytes. **Eur J Pharmacol.** v. 292, p.337-340, 1995

GODOI A.F.L.; FAVORETO R. & SANTIAGO-SILVA M. Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. **Quím. Nova.** v.26, p. 708-716, 2003

GYÖRKE I.; HESTER N.; JONES LR & GYÖRKE S. The Role of Calsequestrin, Triadin, and Junctin in Conferring Cardiac Ryanodine Receptor Responsiveness to Luminal Calcium. **Biophysical Journal**.. v. 86, p. 2121-2128, 2004

GRACELI, J. B.; SENA, G. C.; LOPES, P. F.; ZAMPROGNO, G. C.; DA COSTA, M. B.; GODOI, A. F.; DOS SANTOS, D. M.; DE MARCHI, M. R.; DOS SANTOS FERNANDEZ MA. Organotins: A review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate. **Reproductive Toxicology**, v.36, p. 40-52, 2012

GROTE, K.; STAHLSCHMIDT, B.; TALSNESS, C. E.; GERICKE, C.; APPEL, K. E. & CHAHOUD, I. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. **Toxicology**, v. 202, p.145–158, 2004

GRUN, F. & BLUMBERG, B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. **Endocrinology**, v.147, p.50-55, 2006

GRUN, F.; WATANABE, H.; ZAMANIAN, Z.; MAEDA, L.; ARIMA, K.; CUBACHA, R.; GARDINER, D. M.; KANNO, J.; IGUCHI, T. & BLUMBERG, B. Endocrine disrupting

organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. **Molecular Endocrinology**, v. 20, 2141–2155, 2006

HADJIKAKOU S.K. & HADJILIADIS N. Antiproliferative and anti-tumor activity of organotin compounds. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 253, p. 235–249, 2009

HWANG, H.M., OH, J.R., KAHNG, S.-H., LEE, K.W. Tributyltin compounds in mussels, oysters and sediments of Chinhae Bay, Korea. **Marine Environmental Research**. v.47, p.61–70, 1999

HOCH, M. Organotin compounds in the environment - an overview. **Applied Geochemistry, Mainz**, v. 16, p. 719-743, 2001

ISOMURA M.; KOTAKE Y.; MASUDA K.; MIYARA M.; OKUDA K.; SAMIZO S.; SANO S.; HOSOI T.; OZAWA K. & OHTA S. Tributyltin-induced endoplasmic reticulum stress and its Ca(2+)-mediated mechanism. **Toxicol Appl Pharmacol**. v. 272, p 137-146, 2013

IKEMOTO, N.; M. RONJAT.; L. G. MESZAROS & AND M. KOSHITA. Postulated role of calsequestrin in the regulation of calcium release from sarcoplasmic reticulum. **Biochemistry**. v. 28, p. 6764–6771, 1989

ISHIHARA, Y.; KAWAMI, T.; ISHIDA, A. & YAMAZAKI, T. Tributyltin induces oxidative stress and neuronal injury by inhibiting glutathione S-transferase in rat organotypic hippocampal slice cultures. **Neurochem. Int**. v. 60, p. 782–790, 2012

KATIKA, M. R.; HENDRIKSEN, P. J. M.; LOVEREN, H. V. & PEIJNENBURG, A. Exposure of Jurkat cells to bis (tri-n-butyltin) oxide (TBTO) induces transcriptomics changes indicative for ER- and oxidative stress, T cell activation and apoptosis. **Toxicol. Appl Pharm**. v. 254, p. 311–322, 2011

KATO, T.; TADA-OIKAWA, S.; WANG, L.; MURATA, M. & KURIBAYASHI, K. Endocrine disruptors found in food contaminants enhance allergic sensitization through an oxidative stress that promotes the development of allergic airway inflammation. **Toxicol Appl. Pharm**. v. 273, p 10–18, 2013

KEITHLY, J. C; CARDWELL, R. D. & HENDERSON, D. G. Tributyltin in sea food from Asia, Australia, Europe and North America. **Hum. Ecol. Risk Assess**. v. 5, p. 337-354, 1999

KETATA I.; DENIER X.; HAMZA-CHAFFAI A. & MINIER C. Endocrine-related reproductive effects in molluscs. **Comp. Biochem. Physiol.** v.147, p. 261-270, 2008

KISHTA, O.; ADEEKO, A.; LI, D.; LUU, T.; BRAWER, J. R.; MORALES, C.; HERMO, L.; ROBAIRE, B.; HALES, B. F.; BARTHELEMY, J.; CYR, D. G. & TRASLER, J. M. *In utero* exposure to tributyltin chloride differentially alters male and female fetal gonad morphology and gene expression profiles in the Sprague-Dawley rat. **Reproductive Toxicology**, v. 23, p. 1–11, 2007

KODAVANTI, P.R.S.; CAMERON, J.A.; YALLAPRAGADA, P.R.; VIG, P.J.S. & DESAIAH, D. Inhibition of Ca^{2+} transport associated with cAMP-dependent protein phosphorylation in rat cardiac sarcoplasmic reticulum by triorganotins. **Archives of toxicology**. v. 65, p.311-317, 1991

KÖHLER A.C. SAG C.M & MAIER L.S. Reactive oxygen species and excitation–contraction coupling in the context of cardiac pathology. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 73, p. 92–102, 2014

KONDO, T; ISODA R.; UCHIMURA T.; SUGIYAMA M.; HAMAO K. & HOSOYA H. .Diphosphorylated but not monophosphorylated myosin II regulatory light chain localizes to the midzone without its heavy chain during cytokinesis. **Biochem Biophys Res Commun**, v.417, p.686–691, 2012

LAUGHLIN, R.B. JR; JOHANNESSEN R.B; FRENCH W.; GUARD H.E. & Brinckman F.E.. Structure-activity relationships for organotin compounds.**Environ. Tox.** v.4, p. 343-351, 1985

LEOW, A. C. T.; TOWNS, K. M. & LEAVER, D. D. Effect of organotin compounds and hexachlorophene on brain adenosine cyclic 3'5'-monophosphate metabolism., **Chem. Biol. Interactions**, v. 27, p. 125-132, 1979

LENARCZYK, M., COHEN, E. P., FISH, B. L., IRVING, A. A., SHARMA, M., DRISCOLL, C. D., ET AL. Chronic Oxidative Stress as a Mechanism for Radiation Nephropaty. **Radiation Research**. v. 171, p .164-172, 2009

LEUNG, K.M.Y.; KWONG, R.P.Y.; NG, W.C.; HORIGUCHI, T.; QIU, J.W.; YANG, R.; SONG, M.;JIANG, G.,;ZHENG, G.J.& LAM, P.K.S. Ecological risk assessments of

endocrine disrupting organotin compounds using marine neogastropods in Hong Kong. **Chemosphere**. v. 65, p. 922–938, 2006

LIU, J. Y; SURVEY G. B. & AGRIC J. Survey on the presence of butyltin compounds in chinese alcoholic beverages, determined by using headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-flame photometric detection. **Food Chem**. v. 50, p. 6683-6687, 2002

LOPASCHUK G.D.; USSHER J.R.; FOLMES C.D.; JASWAL J.S. & STANLEY W.C. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. **Physiol Ver**. v.90, p.207–258, 2010

LYSSIMACHOU A.; BACHMANN J. & PORTE C. Short-term exposure to the organotin compound triphenyltin modulates esterified steroid levels in females of *Marisa cornuarietis*. **Aquat. Toxicol**. v. 89 p. 129-135, 2008

MAGEEP. N.; STONER H. R.& BARNES J. B. The experimental production of oedema in the central nervous system of the rat by triethyltin compounds. **J. Pathol. Bacteriol**. v.73, p. 107-124, 1957

MAGUIRE R.J.; TKACZ R.J.; CHAU Y.K; BENGERT G.A.&WONG P.T.S. Occurrence of organotin compounds in water and sediment in Canada. **Chemosphere**. v. 15, p. 253-274, 1986

MATSUNO-YAGI, A. & HATEFI Y. Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation. ATP synthesis by particles inhibited at F₀ by venturicidin and organotin compounds. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 268, p 6168–6173, 1993

MEHROTRA B.D.; PRASADA RAO K.S & DESAIAH D. Effect of plictran on beef heart mitochondrial ATPases. **Toxicol Lett**. v. 26, p. 25-30, 1985

MERLO E.; PODRATZ P.L.;SENA G. C.; DE ARAÚJO J. F.; LIMA L. C.; ALVES I. S.; GAMA-DE-SOUZA L. N., PELIÇÃO R.; RODRIGUES L. C., BRANDÃO P A.; CARNEIRO M.T.; PIRES RG.; MARTINS-SILVA C.; ALARCON TA, MIRANDA-ALVES L; SILVA I. V. & GRACELI J. B. The Environmental Pollutant Tributyltin Chloride Disrupts the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis at Different Levels in Female Rats. **Endocrinology**. v. 157, p. 2978-2995, 2016

MCMURRAY, J. et al. Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. **European Heart Journal**. v. 14, p.1493–1498, 1993.

MILAEVA E.R.; TYURIN V.Y.; SHPAKOVSKY D.B.; GERASIMOVA O.A.; JINGWEI Z. & GRACHEVA Y.A.. Organotins-promoted peroxidation of unsaturated fatty acids: A new antioxidative scavenger for promoters. *Heteroatom Chemistry*. v.17, p.475–480, 2006

MILL JG.; VASSALLO DV.; LEITE CM & CAMPAGNARO P. Influence of the sarcoplasmic reticulum on the inotropic responses of the rat myocardium resulting from changes in rate and rhythm. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 27, p. 1455-1465, 1994

MILLER R. R.; HARTUNG R. & CORNISH H. H. Effects of diethyltin dichloride on amino acid and nucleoside transport in suspended rat thymocytes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 55, p. 564-571, 1980

MITRA, S.; SIDDIQUI, W. A. & KHANDELWAL, S. Differential Susceptibility of Brain Regions to Tributyltin Chloride Toxicity. **Environ. Toxicol.** v.30, p.1393-1405, 2014

MIZUHASHI S.; IKEGAYA Y. & MATSUKI N. Pharmacological property of tributyltin in vivo and in vitro. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v.8 p. 205–212, 2000

MUHAMMAD & GUO Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 19, p. 144-153, 2014

NAKANISHI T. Endocrine disruption induced by organotin compounds; organotins function as a powerful agonist for nuclear receptors rather than an aromatase inhibitor. **J. Toxicol. Sci.** v. 33, p. 269-276, 2008

NATH, M. Toxicity and the cardiovascular activity of organotin compounds: a review. **Applied organometallic chemistry**. v. 22, p. 598-612, 2008

NATH M.; KOMPELLI N, PARTHA ROY P. & SNEHASISH DAS. Metal-based anticancer agents: In vitro DNA binding, cleavage and cytotoxicity. **Internacional Scholary and Scientific Research & Innovation**. v. 8, p.471-477, 2014

NAYLER WG & DUNNET J. A possible explanation for the peculiar contractile behavior displayed by rat heart muscle. **Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism**. v.5, p. 171-175, 1975

NIELSEN J. B. & STRAND J. Butyltin compounds in human liver. **Environ. Res.** v. 88, p. 129-133, 2002

NIGGLI, E. Ca (2+) Sparks in Cardiac Muscle: Is There Life Without Them? News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society v. 14, p. 129-134, 1999

NISHIMURA, T.; DUEREH, M.; SUGITA, Y.; YOSHIDA, Y.; HIGUCHI, K. & TOMI, M. Protective effect of hypotaurine against oxidative stress-induced cytotoxicity in rat placental trophoblasts. **Placenta**. v. 36, n. 6, p. 693–698, 2015.

NISTALA, R., WEI, Y., SOWERS, J. R., & WHALEY-CONNEL, A.. Renin-angiotensin aldosterone system-mediated redox effects in chronic disease. **Subspeciality in translational medicine**. v. 153, p. 102-113, 2009

OBERDÖSTER E.; ROMANO J. & MCCLELLAN-GREEN P. The Neuropeptide APGWamide as a Penis Morphogenic Factor (PMF) in Gastropod Mollusks. **Integr. Comp. Biol.** v. 45, p. 28-32, 2005

ODA Y., YANG Y.; UCHINOUMI H.; THOMAS D.D.; CHEN-IZU Y.; KATO T.; YAMAMOTO T.; YANO M.; RAZVAN L. CORNEA R.L & BERS D.M. Oxidation of ryanodine receptor (RyR) and calmodulin enhance Ca release and pathologically alter, RyR structure and calmodulin affinity. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 85, p. 240–248, 2015

OMURA, M.; OGATA, R.; KUBO, K.; SHIMASAKI, Y.; AOU, S.; OSHIMA, Y.; TANAKA, A.; HIRATA, M.; MAKITA, Y. & INOUE, N. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in male rats. **Toxicology Science**. v. 64, p. 224–232, 2001

PODRATZ, P. L.; DELGADO FILHO, V. S.; LOPES, P. F. I.; SENA, G. C.; MATSUMOTO, S. T.; SAMOTO, V. Y.; TAKIYA, C. M.; DE CASTRO M. E.; SILVA, I.

V. & GRACELI, J. B. Tributyltin impairs the reproductive cycle in female rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. v. 75, p. 1035-46, 2012

POLLER R. C. The Chemistry of Organotin Compounds. **Logos Press**: London, 1970.

RIBEIRO JÚNIOR R.F.; MARQUES V.B.; NUNES D.O.; RONCONI K.DE S.; DE ARAÚJO J.F.; RODRIGUES P.L.; PADILHA A.S.; VASSALLO D.V.; GRACELI J.B. & STEFANON I. Tributyltin chloride increases phenylephrine-induced contraction and vascular stiffness in mesenteric resistance arteries from female rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* v.295, p.26-36.2016

RODRIGUES, S. M. L.; XIMENES, C. F.; BATISTA, P. R.; SIMÕES, F. V.; COSER, P. H. P.; SENA, G. C.; PODRATZ, P. L.; SOUZA, L. N. G.; VASSALLO, D. V.; GRACELI, J. B. & STEFANON, I. Tributyltin contributes in reducing the vascular reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings from female rats. **Toxicol Lett.** v. 225, n. 3, p. 378–385, 2014

ROSENBURG D. W.; DRUMMOND G. S. & KAPPAS A. The influence of organometals on heme metabolism. In vivo and in vitro studies with organotins. **Mol. Pharmacol.** v. 21, p.150-158, 1981

RÜDEL H. Case study: bioavailability of tin and tin compounds. **Ecotox. Environ.** v. 56, p. 180-189, 2003

SADIKI A. I. & WILLIAMS D. T. A Study on Organotin Levels in Canadian Drinking Water Distributed Through PVC Pipes. **Chemosphere.** v.38, p. 1541-1548, 1999

SAHIB I. K. A. & DESAIAH D. Inhibition of β -adrenergic stimulated calcium pump of rat cardiac sarcoplasmic reticulum by tricyclohexyltin hydroxide. **Cell Biochem Funct** v. 5, p. 149-154, 1987

SANTALLA R.P. Especificação de organoestânicos em matrizes ambientais por extracção sorptiva em barra de agitação e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Dissertação, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2008

SARRADIN, P.M.; LAPAUQUERIE, Y.; ASTRUC, M.; LATOUCHE, C. & ASTRUC, M. Long term behaviour and degradation kinetics of tributyltin in a marina sediment. **Sci of the Total Environ.**, v.170, p. 59-70, 1995

- SEKIZAWA, J. Health and environmental risk assessment of organotin pollution in Japan, Bull. Nat. Inst. **Health Sciences**. v.116, p.126-131, 1998
- SHIMASAKI Y., KITANO T., OSHIMA Y., INOUE S., IMADA N. & HONJO T., , Tributyltin causes masculinisation in fish. **Environ. Toxicol. Chem.** v. 22, p. 141-144, 2003
- SHIN, D. W.; MA J. & KIM D. H. The asp-rich region at the carboxyl-terminus of calsequestrin binds to Ca^{2+} and interacts with triadin. **FEBS Lett.** v. 486, 178–182, 2000
- SNOEIJ, N. J., P. M. PUNT, A. H. PENNINKS & W. SEINEN: Effects of tri-n-butyltin chloride on energy metabolism, macromolecular synthesis, precursor uptake and cyclic AMP production in isolated rat thymocytes. **Biochem. Biophys. Acta**. v. 852, p. 234-243, 1986b
- SNOEIJ, N.J.; PENNINKS, A.H. & SEINEN, W. Biological activity of organotin compounds — an overview. **Environ. Res.** v. 44, p. 335– 353, 1987
- SOLOMON, R. & KRISHNAMURTY, V. The effect of tributyltin chloride on vascular responses to atrial natriuretic peptide. **Toxicology**. v. 76, p. 39–47, 1992
- STARLING, E. H. & VISSCHER, M. B. The regulation of the energy output of the heart. **The Journal of physiology**, v. 62, p. 243–61, 1927
- TAKAHASHI S.; MUKAI H.; TANABE S.; SAKAYAMA K.; MIYAZAKI T. & MASUNO H. Butyltin in livers of humans and wild terrestrial mammals and in plastic products. **Environ. Pollut.** v.106, p. 213, 1999
- TAKAHASHI, S.; TANABE, S.; TAKEUCHI, I. & MIYAZAKI, N. Distribution and Specific bioaccumulation of butyltin compounds in a Marine Ecosystem. **Environ. Contam. Toxicol.** v. 37, p. 50–61, 1999
- TOLOSA I., READMAN J.W., BLAEVOET A., GHILINI S., BARTOCCI J. & HORVAT M. Contamination of Mediterranean (Côte d’Azur) coastal waters by organotins and Irgarol 1051 used in antifouling paints. **Mar. Pollut. Bull.** v. 32, p. 335-341, 1996
- UNNO T; IIDA R.; OKAWA M.; MATSUYAMA H.; HOSSAIN MM.; KOBAYASHI H & KOMORI S. Tributyltin-induced Ca^{2+} mobilization via L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels in PC12 cells. **Environ Toxicol Pharmacol.** v. 28, p.70-77, 2009

VASSALLE M. & LIN C. Calcium overload and cardiac function **.J Biomed Sci.** v. 11, p. 542–565, 2004

VASSALLO, D. V et al. Lead reduces tension development and the myosin ATPase activity of the rat right ventricular myocardium. **Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica**, v. 41, p. 789–95, 2008.

VIVIANI, B.; ROSSI, A.D.; CHOW, S.C. & NICOTERA, P. Organotin compounds induce calcium overload and apoptosis in PC12 cells. **Neurotoxicology** v. 16, p. 19-25, 1995

VON BALLMOOS, C., BRUNNER, J., & DIMROTH, P. The ion channel of F-ATP synthase is the target of toxicorganotin compounds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p 11239–11244, 2004

VOS, J. G.; DYBING, E.; GREIM, H. A.; LADEFOGED, O.; LAMBRE, C.; TARAZONA, J. V.; BRANDT, I. & VETHAAK, A. D. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, p. 71–133, 2000

XIMENES, C.F. Efeitos da exposição por quinze dias ao tributilestano (500 ng/kg) sobre a reatividade e morfologia da aorta de ratas, Dissertação de Mestrado, 2016

XIANG YK. Compartmentalization of beta-adrenergic signals in cardiomyocytes. **Circ Res.** v.109, p. 231–244, 2011

WADA, O.; MANABE, S.; IWAI, H. & ARAKAWA, Y. Recent progress in study of analytical methods, toxicity, metabolism and health effects of organotin compounds. **Sangyo Igaku**, v. 24, p. 24-54, 1982

WALEN, M.M; LOGANATHAN, B.G & KANNAN, K. Immunotoxicity of environmentally relevant concentrations of butyltins on human natural killer cells in vitro. **Environ.Res.** v. 81, p. 108-116, 1999

ZHANG, L.; KELLEY J.; SCHMEISSER G.; KOBAYASHI Y. M., & JONES L. R. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. **J. Biol. Chem.** v. 272, p 23389–23397, 1997